- (43)Дата публикации заявки 2022.07.22
- Дата подачи заявки (22)2020.12.01

(51) Int. Cl. A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/39** (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01) C12N 5/0783 (2010.01) *C12N 15/12* (2006.01) A61K 35/12 (2015.01) A61K 35/22 (2015.01)

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ АДЪЮВАНТНЫХ ВЕКТОРНЫХ КЛЕТОК (aAVC)

- 2019-217712 (31)
- (32)2019.12.02
- (33)JP
- (86)PCT/JP2020/044587
- (87)WO 2021/112056 2021.06.10
- (71) Заявитель:

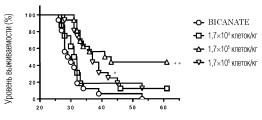
АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК.; РИКЕН (JP)

(72) Изобретатель:

Охсуми Кейсуке, Ёсида Таку, Канки Масаюки, Фудзии Синитиро, Симидзу Канако (ЈР)

(74) Представитель: Медведев В.Н. (RU)

Техническая проблема для решения изобретением. Изобретение относится к эффективному (57)и безопасному способу лечения или профилактики рака с использованием aAVC. Решение технической проблемы. Изобретение находит подходящие диапазоны доз α-GalCer, загруженного на поверхность клеток aAVC, и количество α-GalCer, загруженного на клеточную поверхность аAVC, в фармацевтической композиции, содержащей аAVC, которые являются предпочтительными с точки зрения обеспечения эффективности и безопасности в лечении и профилактике рака с использованием аАVC, и обеспечивает эффективный и безопасный способ лечения или профилактики рака с использованием aAVC, aAVC для эффективного и безопасного лечения или профилактики рака и фармацевтической композиции, содержащей ее, и т.д.



Количество дней после прививки опухоли

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574419EA/025

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИСКУССТВЕННЫХ АДЪЮВАНТНЫХ ВЕКТОРНЫХ КЛЕТОК (aAVC)

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к эффективному и безопасному способу лечения или профилактики рака с использованием искусственной адъювантной клетки (aAVC).

Уровень техники

[0002] Естественные Т-клетки-киллеры (NKT) представляют собой иммунные клетки, обладающие свойствами Т-клеток и естественных клеток-киллеров (NK), и активируются лигандом CD1d, состоящим из гликолипида, загруженного на молекулу CD1d, подобную молекуле главного комплекса гистосовместимости (MHC), на антигенпрезентирующей клетки (APC). Известно, что активированные NKT-клетки индуцируют усиление прямой цитотоксичности, опосредованной перфорином/гранзимом В и т. д., а также продуцируют цитокины, такие как интерферон гамма (IFN- γ) или интерлейкин-4 (IL-4), тем самым индуцируя дифференцировку и пролиферацию самих NKT-клеток и активацию Т-клеток, NK-клеток и В-клеток.

[0003] Лиганды CD1d, способные активировать NKT-клетки, включают, например, α -галактозилцерамид (α -GalCer), α -С-галактозилцерамид (α -C-GalCer), 7DW8-5 и изоглоботригексозилцерамид (iGb3). Известные CD1d-экспрессирующие APC включают, например, макрофаги, дендритные клетки (DC), В-клетки и клетки В-клеточного лимфоцитарного лейкоза (B-CLL).

[0004] NKT-клетки, активированные DC, подвергшиеся стимуляции под действием α -GalCer, проявляют цитотоксичность по отношению к различным опухолевым клеткам. Сообщалось, что DC, стимулированные α -GalCer, эффективнее индуцируют IFN- γ -продуцирующие NKT-клетки и проявляют высокий противоопухолевый эффект по сравнению с введением свободного α -GalCer (непатентные документы 1 и 2). Также были проведены клинические испытания с участием пациентов с раком легких (непатентные документы 3 и 4).

[0005] Сообщалось, что на мышиных моделях введение α -GalCer индуцирует противоопухолевый эффект посредством активации врожденного иммунитета через активацию NKT-клеток, в то время как побочные эффекты, такие как некроз гепатоцитов, проявляются в результате продукции воспалительных цитокинов, ассоциированных с активацией NKT-клеток и т. д. (непатентный документ 5). Кроме того, в клинических испытаниях α -GalCer было установлено, что введение α -GalCer индуцировало иммунный ответ, приводящий к противоопухолевому эффекту, и, с другой стороны, было обнаружено, что он вызывает нежелательные явления, свидетельствующие об ухудшении общего состояния, такие как головная боль, рвота, озноб и чувство недомогания, что указывает на возможность развития различных побочных реакций (непатентный документ

6).

[0006] Fujii et al. получили aAVC, посредством индукции клеток человеческого происхождения экзогенно экспрессировать CD1d и опухолевый антиген, и дополнительно стимулируя клетки под действием α-GalCer (патентные документы 1-3). Такие aAVC активируют NKT-клетки через их комплекс CD1d/α-GalCer, и активированные NKTклетки продуцируют цитокины, такие как IFN-ү, который активирует NK-клетки и т.п. На мышиных моделях было показано, что введение aAVC оказывает противоопухолевый эффект, зависимый от NK-клеток (патентные документы 1-3 и непатентные документы 7 и 8). aAVC, введенные мышам, немедленно подвергаются киллингу активированными NKTклетками in vivo, и фрагменты aAVC поглощаются дендритными клетками. Дендритные клетки с поглощенными таким образом фрагментами aAVC презентируют опухолевый антиген, включенный в МНС на клеточной поверхности, и индуцируют опухолевый антиген-специфические Т-клетки. На мышиных моделях также было показано, что введение aAVC оказывает противоопухолевый эффект за счет индукции опухолевый антиген-специфических Т-клеток (патентные документы 1-3 и непатентные документы 7 и 8). Таким образом, было показано, что аАVC способны эффективно индуцировать два иммунных механизма, т. е. активацию врожденного иммунитета, проявляющуюся в активации NK-клеток, опосредованной активацией NKT-клеток, и индукцию адаптивного иммунитета, проявляющуюся в индукции антигенспецифических Т-клеток. Однако до сих пор не проводилось исследований для определения точной клинической дозы аАVC, которая оказывает противоопухолевый эффект за счет активации врожденного иммунитета и которую можно безопасно использовать.

Список цитированных ссылок

Патентные документы

[0007] Патентный документ 1: Международная публикация № WO 2007/097370

Патентный документ 2: Международная публикация № WO 2010/061930

Патентный документ 3: Международная публикация № WO 2013/018778

Непатентные документы

Непатентный документ 1: «The Journal of Immunology», (USA), 1999; 163 (5): 2387-2391

Непатентный документ 2: «Nature Immunology», (USA), 2002; 3 (9): 867-874

Непатентный документ 3: «The Journal of Immunology», (USA), 2009; 182 (4): 2492-2501

Непатентный документ 4: «Clinical Cancer Research», (USA), 2005; 11 (5): 1910-1917

Непатентный документ 5: «Anticancer Research», 2016; 36 (7): 3667-3672

Непатентный документ 6: «Clinical Cancer Research», (USA), 2002; 8 (12): 3702-3709

Непатентный документ 7: «Cancer Research», (USA), 2013; 73 (1): 62-73

Непатентный документ 8: «Cancer Research», (USA), 2016; 76 (13): 3756-3766.

Сущность изобретения

Техническая проблема для решения изобретением

[0009] Целью настоящего изобретения является обеспечение эффективного и безопасного способа лечения или профилактики рака с использованием aAVC.

Решение технической проблемы

[0010] Авторы настоящего изобретения провели обстоятельные исследования по клиническому применению aAVC. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что количество α-GalCer, загруженное в aAVC, в ходе процессов получения aAVC, варьируется в зависимости от типа клеток и условий стимуляции клеток под действием а-GalCer и т. д. Была обнаружена необходимость стандартизации количества α-GalCer, загруженного на aAVC, что дает возможность получить aAVC в качестве лекарственных препаратов. Следовательно, авторы настоящего изобретения разработали способ измерения количества α-GalCer, загруженного на клеточную поверхность, количественного определения количества α-GalCer, загруженного на aAVC. Авторы настоящего изобретения также подтвердили, что добавление различных концентраций а GalCer в среду при стимуляции aAVC под действием α-GalCer приводит к изменениям количества α-GalCer, загруженного на клетку (пример 2). Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что доза α-GalCer, загруженная на aAVC, связана с индукцией противоопухолевого эффекта и побочных реакций, ассоциированных с активацией врожденного иммунитета, опосредованной NKT-клетками (примеры 3-5). Таким образом, авторы настоящего изобретения успешно нашли дозу α-GalCer, загруженную на aAVC, и количество α-GalCer, загруженного на aAVC, в фармацевтической композиции, содержащей aAVC, которые являются предпочтительными с точки зрения эффективности и безопасности в лечении и профилактике рака с использованием aAVC. В частности, настоящее изобретение относится к эффективному и безопасному способу лечения или профилактики рака с использованием aAVC, к aAVC для эффективного и безопасного лечения или профилактики рака, а также фармацевтической композиции, содержащей ее, ит. д.

[0011] В частности, настоящее изобретение может включать следующие аспекты в качестве соединения или способа, применимых с медицинской или промышленной точки зрения.

[0012] 1. Способ лечения или профилактики рака, включающий стадию введения клетки человеческого происхождения, человеку,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

и где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 2. Способ по п.1, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
 - 3. Способ по пп.1 или 2, где CD1d представляет собой CD1d человека.
 - 4. Способ по любому из пп.1-3, где клетка человеческого происхождения

представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).

- 5. Способ по любому из пп.1-4, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 6. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики рака, содержащая клетку человеческого происхождения,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

и где композицию вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 7. Фармацевтическая композиция по п.6, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
- 8. Фармацевтическая композиция по пп.6 или 7, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.6-8, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.6-9, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 11. Применение клетки человеческого происхождения для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

и где композицию вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 12. Применение по п.11, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
 - 13. Применение по пп.11 или 12, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 14. Применение по любому из пп.11-13, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 15. Применение по любому из пп.11-14, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 16. Клетка человеческого происхождения для применения в лечении или профилактике рака,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

- и где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.
- 17. Клетка человеческого происхождения по п.16, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
- 18. Клетка человеческого происхождения по пп.16 или 17, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 19. Клетка человеческого происхождения по любому из пп.16-18, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 20. Клетка человеческого происхождения по любому из пп.16-19, где количество α -GalCer, загруженное на поверхность клетки, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 21. Способ получения клетки человеческого происхождения, которая экспрессируют экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность, где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека, и где способ включает стадию культивирования клеток человеческого происхождения, экспрессирующих экзогенный CD1d, в культуральной среде, содержащей от 56 нг/мл до 3000 нг/мл α -GalCer.
- 22. Способ по п.21, дополнительно включающий стадию измерения количества α -GalCer, загруженного на клетки, полученные на стадии культивирования, и отбор клетки, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в пределах от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.

Преимущественные эффекты изобретения

[0013] Способ по настоящему изобретению можно использовать для эффективной и безопасной профилактики или лечения рака с использованием aAVC.

Краткое описание фигур

[0014] На фиг. 1 показано изменение выживаемости после введения аAVC(3T3)-WT1 на мышиной модели меланомы B16 с метастазами в легкие, где опухолевые клетки вводили внутривенно. Клетки B16-F10 вводили в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 7 недель по 2×10^4 клеток, и через 3 ч после введения опухолевых клеток в хвостовую вену мышей вводили раствор BICANATE (бикарбонатный раствор Рингера) или каждую дозу aAVC(3T3)-WT1 (n=16 мышей в каждой группе). Выживаемость мышей оценивали в течение 61 суток после введения. Выживаемость в группе с введением aAVC(3T3)-WT1 сравнивали с выживаемостью в группе с введением раствора BICANATE с использованием лог-рангового критерия для определения Р-значения уровня значимости. На фигуре * и ** указывают, что Р-значение ниже уровней значимости 0,05/3 и 0,01/3 соответственно, с поправкой Бонферрони.

На фиг. 2 показано относительное количество (%) NKT-клеток в клетках селезенки

после введения aAVC(3T3)-WT1 или каждой aAVC-WT1, приведенной в таблице 2. Раствор BICANATE или каждую дозу aAVC(3T3)-WT1 или aAVC-WT1 вводили в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 5 недель (n=3 мышей в каждой группе). Через 3 суток после введения отбирали селезенку и определяли NKT-клетки с использованием проточной цитометрии. Относительное количество NKT-клеток определяли как долю CD1d/Gal-димер-позитивных и CD19-негативных клеток во фракции лимфоцитов на цитограмме прямого рассеивания и бокового рассеяния и обозначали на графике как среднее значение \pm стандартная ошибка. Числовые значения на оси X указывают количество α -GalCer, загруженного на aAVC (нг/10 6 клеток).

На фиг. 3 приведены результаты определения массы тела мышей-самцов или мышей-самок в исследовании с целью оценки токсичности после однократного внутривенного введения aAVC-WT1 мышам. Раствор BICANATE или каждую дозу aAVC-WT1 вводили однократно в хвостовую вену каждой мыши-самке или мыши-самцу C57BL/6J в возрасте 8 недель (n=5 мышей в каждой группе). Массу тела измеряли за день до введения (день -1), в день введения (день 0), на следующий день после введения (день 1), через 3 дня после введения (день 3) и через 7 дней после введения (день 7), и результаты приведены на графике.

На фиг. 4 приведены результаты определения потребления корма мышами-самцами или мышами-самками в исследовании с целью оценки токсичности при однократном внутривенном введении мышам. Раствор BICANATE или каждую дозу aAVC-WT1 вводили однократно в хвостовую вену каждой мыши-самке или мыши-самцу C57BL/6J в возрасте 8 недель (n=5 мышей в каждой группе). Потребление корма в день (г/день) определяли, начиная от 3 дней до введения до дня до введения (дни от -3 до -1), от дня введения до 1 дня после введения (дни 0 до 1), от 1 дня после введения до 3 дней после введения (дни 1-3) и от 3 дней после введения до 7 дней после введения (дни 3-7), и результаты приведены на графике.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

[0015] Далее настоящее изобретение будет описано подробно. Однако настоящее изобретение не ограничивается вариантами осуществления, описанными ниже. Научные термины и технические термины, используемые при описании настоящего изобретения, имеют значения, обычно понятные специалистами в данной области техники, если здесь не указано иное.

[0016] «Способ лечения или профилактики рака по настоящему изобретению»

Настоящее изобретение относится к следующему способу лечения или профилактики рака:

где способ лечения или профилактики рака включает стадию введения клетки человеческого происхождения человеку,

где клетка экспрессирует экзогенный или эндогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

и где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer,

загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

[0017] «1. aAVC»

В способе по настоящему изобретению можно использовать клетки человеческого происхождения, которые экспрессируют экзогенный или эндогенный CD1d и содержат α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность (также в настоящем описании относится к аAVC). аAVC может дополнительно экспрессировать один или более экзогенных или эндогенных опухолевых антигенов. Несмотря на то, что аAVC без экспрессии опухолевых антигенов может активировать NKT-клетки и проявлять определенную степень противоопухолевого эффекта, аAVC, экспрессирующие опухолевые антигены, имеют больше преимуществ для индукции адаптивного иммунитета против рака. Специалисты в данной области могут легко получить аAVC с использованием способа, известного в данной области (например, непатентные документы 7 и 8 и патентные документы 1-3).

[0018] Клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, может представлять собой клетку, полученную из произвольной ткани человека, например, ткани желудка, тонкого кишечника, толстого кишечника, легкого, поджелудочной железы, почки, печени, тимуса, селезенки, предстательной железы, яичника, матки, костного мозга, кожи, мышц или периферической крови. Клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, может обладать способностью к пролиферации. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, не представляет собой гемоцит. Клеткой человеческого происхождения, используемой в настоящем изобретении, может быть клетка, полученная из клеток определенного типа в ткани человека (например, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, эпидермальные клетки, стромальные клетки, фибробласты, адипоциты, клетки молочной железы, мезангиальные клетки, а клетки поджелудочной железы, нервные клетки, глиальные клетки, экзокринные эпителиальные клетки, эндокринные клетки, клетки скелетных мышц, клетки гладкой мускулатуры, клетки миокарда, остеобласты, эмбриональные клетки и иммунные клетки). Клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, может представлять собой нормальную клетку или опухолевую клетку. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой нормальную клетку. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, может представлять собой клетку эмбриональной почки человека 293 (HEK293) (J. Gen. Virol.; 1977; 36: 59-74), клетку WI-38, клетку SC-01MFP и клетку MRC-5 или клетку, полученную из любой из этих клеток. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой клетку, происходящую от НЕК293. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой клетку FreeStyleTM 293-F.

[0019] В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой иммортализованную клетку или клеточную линию, полученную из ткани человека. Иммортализованную клетку и клеточную линию можно получить способами, известными специалистам в данной области.

[0020] В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS-клетка) или эмбриональную стволовую клетку (ES-клетка) человека. iPS-клетка и ES-клетка могут быть получены с использованием способов, известных специалистам в данной области. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой клетку, полученную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS-клетка) или эмбриональной стволовой клетки (ES-клетка) человека.

[0021] В рамках настоящего изобретения, CD1d может представлять собой встречающийся в природе CD1d или модифицированную форму, обладающую его функциями. CD1d может представлять собой CD1d, который эндогенно экспрессируется в используемой клетке человеческого происхождения, или может представлять собой CD1d, используемой экзогенно экспрессируется В клетке происхождения. В одном варианте экспрессия означает экспрессию в любом положении в клетке. В одном варианте экспрессия означает экспрессию на клеточной поверхности. В одном варианте осуществления aAVC экспрессирует экзогенный CD1d. В одном варианте осуществления CD1d, используемый в настоящем изобретении, представляет собой CD1d, происходящий от млекопитающих (например, людей, обезьян, мышей, крыс, собак и шимпанзе). В одном варианте осуществления CD1d, используемый в настоящем изобретении, представляет собой CD1d человека.

[0022] В рамках настоящего изобретения, термины «экзогенный» или «экзогенно» используются взаимозаменяемо и относятся к искусственному переносу гена или нуклеиновой кислоты в представляющую интерес клетку с использованием такой процедуры, как генная инженерия или перенос гена, и ген или нуклеиновую кислоту искусственно вводят в представляющую интерес клетку, или белок экспрессируется из них. Экзогенный ген может быть операбельно связан с промоторной последовательностью, которая направляет экспрессию гена.

[0023] В рамках настоящего изобретения, термины «эндогенный» или «эндогенно» означают, что клетка изначально обладает веществом, например, геном, нуклеиновой кислотой или белком.

[0024] В рамках настоящего изобретения, термин «происходящая» используется для обозначения вида животного, от которого была получена клетка. Например, клетка человеческого происхождения означает, что клетка представляет собой клетку, полученную от человека, или клеточную линию, полученную субкультивированием клетки. Например, клетка человеческого происхождения означает, что клетка является

клеткой человека.

[0025] В рамках настоящего изобретения, термин «идентичность» означает значение идентичности, полученное из параметров, полученных в виде значений по умолчанию, с использованием пакета Needle EMBOSS (Nucleic Acids Res.; 2015; 43: W580-W584). Описанные выше параметры следующие:

Штраф за открытие гэпа=10

Штраф за удлинение гэпа=0,5

Матрица=EBLOSUM62

Штраф за концевой гэп=не задан.

[0026] В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой белок, состоящий из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой белок, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4 с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением 1 или нескольких аминокислот или, в некоторых вариантах осуществления, от 1 до 10, от 1 до 7, от 1 до 5, от 1 до 3, или 1 или 2 аминокислот, и обладает функцией CD1d. В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой белок, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 4, и обладает функцией CD1d. В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой белок, состоящий из аминокислотной последовательности, кодированной нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 3.

[0027] Примеры функции CD1d включают способность связываться с лигандом CD1d (например, α-GalCer). Специалисты в данной области могут легко оценить способность CD1d связываться с лигандом CD1d с использованием метода, известного в данной области. Альтернативно функцию CD1d можно оценить, используя в качестве показателя способность aAVC активировать NKT-клетки человека. Эту способность активировать NKT-клетки человека можно оценить методом, описанным в патентном документе 1 или примере 4 настоящей заявки.

[0028] В одном варианте осуществления аAVC, используемая в настоящем изобретении, экспрессирует опухолевый антиген. В качестве опухолевого антигена, используемого в настоящем изобретении, можно использовать произвольный белок, экспрессия которого обнаружена в опухолевых клетках. Примеры опухолевых антигенов включают антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1), человеческий углеводный антиген 125 (CA-125), карциноэмбриональный антиген (CEA), обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), муцин-1 (Muc-1), муцин-2 (Muc-2), антиген рака/яичка 1В (CTAG1B/NY-ESO-1), фосфатазу предстательной железы (PAP), простатспецифический антиген (PSA), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), сурвивин b, мутант газ и мутант р53. В одном варианте осуществления опухолевый антиген, используемый в

настоящем изобретении, представляет собой антиген опухоли Вильмса 1 (WT-1). В одном варианте осуществления WT-1 представляет собой WT-1 человека. В одном варианте осуществления человеческий WT-1 представляет собой белок, состоящий аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2. В одном варианте человеческий WT-1 представляет собой белок, осуществления состоящий аминокислотной последовательности, полученной аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением 1 или нескольких аминокислот или, в некоторых вариантах осуществления, от 1 до 10, от 1 до 7, от 1 до 5, от 1 до 3, или 1 или 2 аминокислот. В одном варианте осуществления WT-1 человека представляет собой белок, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей, по меньшей мере, 90% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более или 99% или более идентичность с аминокислотной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления аAVC экспрессирует один опухолевый антиген. В одном варианте осуществления аAVC множество опухолевых Опухолевый экспрессирует антигенов. антиген может представлять собой природный опухолевый антиген или его модифицированную форму aAVC, условии, что экспрессирующая опухолевый антиген, проявляет эффект противоопухолевый посредством иммунологического действия против опухолевого антигена. Опухолевый антиген может представлять собой антиген, эндогенно экспрессируемый в используемых клетках человеческого происхождения, или может представлять собой антиген, экзогенно экспрессируемый в используемых клетках человеческого происхождения. В одном варианте осуществления aAVC экспрессирует экзогенный опухолевый антиген. В одном варианте осуществления aAVC экспрессирует множество экзогенных опухолевых антигенов.

[0029] α -GalCer является одним из лигандов CD1d и представляет собой соединение с регистрационным номером CAS: 158021-47-7 и молекулярной формулой: $C_{50}H_{99}NO_{9}$ (молекулярная масса: 858,34). α -GalCer можно синтезировать в соответствии с методикой, известной в данной области, или можно использовать коммерчески доступный продукт (например, α -галактозилцерамид (Funakoshi Co., Ltd., номер по каталогу KRN7000)). Загрузка α -GalCer на клетки может осуществляться культивированием клеток, экспрессирующих CD1d, в среде, содержащей α -GalCer, как описано в разделе «2. Способ получения aAVC».

[0030] «2. Способ получения aAVC»

Настоящее изобретение может включать получение клеток на стадии перед загрузкой α -GalCer (также относится к клеткам-предшественникам aAVC в настоящем описании) и загрузку α -GalCer на клетки-предшественники aAVC. Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки, где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность; где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека; и где способ включает стадию

культивирования клеток человеческого происхождения, экспрессирующих экзогенный CD1d, в культуральной среде, содержащей от 56 нг/мл до 3000 нг/мл α -GalCer. Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки, где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность; где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека; и где способ включает стадию культивирования клеток человеческого происхождения, экспрессирующих экзогенный CD1d, в культуральной среде, содержащей от 56 нг/мл до 3000 нг/мл α -GalCer, и стадию отбора клетки, в которой количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность находится в пределах от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.

[0031] «2-1. Получение клеток-предшественников аAVC»

Клетки-предшественники aAVC можно получить введением либо гена CD1d, либо гена, кодирующего опухолевый антиген, либо гена CD1d и гена, кодирующего опухолевый антиген, в клетки человеческого происхождения. Ген CD1d и ген, кодирующий опухолевый антиген, могут быть сконструированы и получены с использованием стандартного молекулярно-биологического и/или химического метода посредством получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, по идентификационным номерам из баз данных NCBI RefSeq или GenBank. Данные гены можно синтезировать, например, с использованием фосфорамидитного метода на основе ИХ нуклеотидных последовательностей или можно получить объединением фрагментов ДНК, полученных с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) из библиотек кДНК. Перенос представляющих интерес генов в клетки человеческого происхождения может быть осуществлен с использованием экспрессионного вектора, содержащего ген, подлежащий введению, в форме кДНК, мРНК и т.п. В качестве альтернативы интересующие гены могут быть введены непосредственно в клетки человеческого происхождения с помощью такого метода, как электропорация, липофекция и т.п. Кроме того, после введения интересующего гена в клетки человеческого происхождения для получения клетокпредшественников aAVC эти клетки можно культивировать и размножить.

[0032] Экспрессионный вектор, используемый в настоящем изобретении, особым образом не ограничивается, при условии, что экспрессионный вектор обеспечивает экспрессию CD1d или представляющего интерес опухолевого антигена, или CD1d и представляющего интерес опухолевого антигена в клетках человеческого происхождения. Экспрессионный вектор может представлять собой, например, плазмидный вектор (например, серию pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER®-MAX (Promega Corp.) и pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.)) или вирусный вектор (например, на основе лентивируса, аденовируса, ретровируса и аденоассоциированного вируса). Например, для получения лентивируса можно использовать вектор pLVSIN-CMV/EF1α (Takara Bio Inc.) или вектор pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.) при получении вирусного

вектора. Когда CD1d и опухолевый антиген экзогенно экспрессируются в клетках человеческого происхождения, то CD1d и опухолевый антиген могут экспрессироваться с использованием либо одного вектора, либо отдельных векторов.

[0033] Экспрессионный вектор может содержать промотор, операбельно связанный с геном, кодирующим CD1d или опухолевый антиген. В качестве промотора можно использовать любой из промоторов, которые обеспечивают конститутивную экспрессию, и промоторов, контролируемых лекарственным препаратом (например, тетрациклином или доксициклином) или т.п. Примеры промоторов, которые обеспечивают конститутивную экспрессию, включают промоторы, полученные из вирусов, таких как CMV (цитомегаловирус), RSV (респираторно-синцитиальный вирус) и SV40 (обезьяний вирус 40), промотор актина и промотор EF-1 α (фактора элонгации). Примеры индуцибельного промотора включают тетрациклин-контролируемый фактор (промотор TRE3G), последовательность куматного оператора, последовательность λ -оператора $(12 \times \lambda Op)$ и промотор теплового шока.

[0034] Экспрессионный вектор может содержать старт-кодон и стоп-кодон. В этом случае экспрессионный вектор может содержать энхансерную последовательность, нетранслируемую область, границу сплайсинга, сайт полиаденилирования или репликативную единицу и т. д. Экспрессионный вектор может также содержать ген, способный служить в качестве маркера для подтверждения экспрессии представляющего интерес гена (например, ген устойчивости к лекарственным препаратам, ген, кодирующий репортерный фермент, или ген, кодирующий флуоресцентный белок).

[0035] В одном варианте осуществления клетки-предшественники аAVC получают введением гена CD1d в клетки человеческого происхождения с использованием вирусного вектора. В одном варианте осуществления клетки-предшественники аAVC, используемые в настоящем изобретении, представляют собой клетки, экзогенно экспрессирующие CD1d, полученные с использованием вирусного вектора. В данном варианте осуществления клетки-предшественники аAVC могут содержать ген, кодирующий CD1d, где данный ген операбельно связан с промотором. В одном варианте осуществления клетки-предшественники aAVC получают введением гена CD1d и гена, кодирующего опухолевый антиген, в клетки человеческого происхождения с использованием вирусного вектора. В одном варианте осуществления клетки-предшественники aAVC, используемые в настоящем изобретении, представляют собой клетки, в которых CD1d и опухолевый антиген экзогенно экспрессируются при использовании вирусного вектора. В данном варианте осуществления клетки-предшественники аAVC могут содержать ген CD1d и ген, кодирующий опухолевый антиген, где каждый ген операбельно связан с промотором.

[0036] В одном варианте осуществления клетки-предшественники aAVC получают введением гена CD1d в клетки человеческого происхождения с использованием лентивирусного вектора. В одном варианте осуществления клетки-предшественники aAVC, используемые в настоящем изобретении, представляют собой клетки, в которых CD1d экзогенно экспрессируется при использовании лентивирусного вектора. В одном

варианте осуществления клетки-предшественники аAVC получают введением гена CD1d и гена, кодирующего опухолевый антиген, в клетки человеческого происхождения с использованием лентивирусного вектора. В одном варианте осуществления клетки-предшественники аAVC, используемые в настоящем изобретении, представляют собой клетки, в которых CD1d и опухолевый антиген экзогенно экспрессируются при использовании лентивирусного вектора.

[0037] Клетки-предшественники aAVC культивируют способом, известным в данной области. Например, среду MEM (Science; 1952; 122:501), среду DMEM (Virology; 1959; 8:396-397), среду RPMI1640 (J. Am. Med. Assoc.; 1967; 199: 519-524), среду 199 (Proc. Soc. Exp. Biol. Med.; 1950; 73: 1-8), среду для экспрессии FreeStyleTM 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 12338022), среду CD 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 11913019) или среду для экспрессии Expi293TM (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу A1435101) можно использовать в качестве базальной среды. Культуральная среда может содержать, например, сыворотку (например, фетальную бычью сыворотку), заменитель сыворотки (например, заменитель сыворотки KnockOut: KSR), жирную кислоту или липид, аминокислоту, витамин, ростовый фактор, пировиноградную антиоксидант, 2-меркаптоэтанол, кислоту, цитокин, неорганическую соль или антибиотик. Специалисты в данной области могут быть соответствующим образом выбрать условия культивирования (например, условия культивирования, такие как время культивирования, температура, рН среды и концентрация СО₂). Значение рН среды предпочтительно составляет примерно от 6 до 8. Температура культивирования особым образом не ограничивается и составляет, например, примерно от 30°C до 40°C, предпочтительно примерно 37°C. Концентрация СО2 составляет примерно от 1% до 10%, предпочтительно примерно 5%. Время культивирования особым образом не ограничивается, и культивирование проводят в течение примерно от 15 ч до 336 ч. При необходимости можно проводить аэрацию или перемешивание. В случае использования промотора, контролируемого лекарственным препаратом, таким как тетрациклин или доксициклин, способ может включать стадию культивирования клеток-предшественников aAVC в среде с добавлением лекарственного препарата для индукции экспрессии CD1d и опухолевого антигена. Данную стадию можно выполнить в соответствии с методом индукции генов с использованием общей системы индукции генов.

[0038] «2-2. Загрузка α-GalCer на клетку»

аAVC, содержащую α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность, получают стимулирующей обработкой клеток-предшественников aAVC с использованием α -GalCer. В рамках настоящего изобретения, выражение «загрузка α -GalCer на клеточную поверхность» относится к состоянию, когда α -GalCer связывается с поверхностью клетки aAVC. Количество связанного α -GalCer можно измерить с использованием метода, описанного в разделе «2-3. Измерение количества α -GalCer, загруженного на aAVC». В рамках настоящего изобретения, термин «стимулирующая обработка» с использованием

 α -GalCer относится к приведению в контакт клеток-предшественников aAVC с α -GalCer для связывания α -GalCer с клеточной поверхностью клеток-предшественников aAVC, экспрессирующих CD1d. Стимулирующую обработку можно проводить в среде для культивирования клеток.

[0039] Специалисты в данной области могут соответствующим образом скорректировать условия стимулирующей обработки клеток-предшественников aAVC (например, время добавления α-GalCer в клеточную культуральную среду, концентрация α-GalCer в культуральной среде и время культивирования) с учетом используемых клеток-предшественников aAVC и условий культивирования. Концентрация α-GalCer, добавляемая в культуральную среду для клеток-предшественников aAVC, особым образом не ограничивается, и может быть соответствующим образом выбрана в диапазоне, например, от 56 нг/мл до 3000 нг/мл.

[0040] Получение клеток-предшественников aAVC и стимулирующую обработку клеток с использованием α-GalCer можно проводить одновременно с введением гена CD1d или опухолевого антигена или CD1d и опухолевого антигена в клетки человеческого происхождения в присутствии α-GalCer.

[0041] После загрузки α -GalCer на клеточную поверхность, α -GalCer, который не был загружен на клеточную поверхность (избыток α -GalCer в культуральной среде), можно удалить.

[0042] После стимулирующей обработки клеток-предшественников aAVC с помощью α-GalCer пролиферацию aAVC можно остановить с использованием искусственного способа. Способ остановки пролиферации aAVC особым образом не ограничивается. Например, можно использовать способ остановки пролиферации клеток воздействием корпускулярного излучения, такого как радиоактивные лучи (например, рентгеновские лучи или гамма-лучи), или способ добавления лекарственного препарата, такого как митомицин С.

[0043] «2-3. Измерение количества α-GalCer, загруженного на aAVC»

Авторы настоящего изобретения разработали способ измерения количества α -GalCer, загруженного на клеточную поверхность aAVC. Измерение количества α -GalCer, загруженного на клеточную поверхность aAVC, можно выполнить приготовлением клеточных экстрактов aAVC и количественным определением α -GalCer в экстрактах методом масс-спектрометрии (MC) (например, жидкостной хроматографией-тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-MC/MC)).

[0044] В общем количественном анализе с использованием ЖХ-МС/МС количественное определение α-GalCer в образце проводится следующими стадиями.

Стадия 1: анализ стандартов α -GalCer, приготовленных в нескольких концентрациях.

Стадия 2: получение временного изменения ионной силы (масс-спектр) для m/z (отношение масса/заряд) ионов, полученных из стандартов, и расчет площади пиков на масс-спектре.

Стадия 3: построение калибровочной кривой на основе отношения между площадью пика каждого соединения, определенной на стадии 2, и концентрацией соединения.

Стадия 4: количественный анализ образца, подлежащего количественному определению, для расчета площади пика на масс-спектре α -GalCer в образце.

Стадия 5: расчет концентрации α-GalCer в образце, соответствующей площади пика на масс-спектре на стадии 4, на основе калибровочной кривой, построенной на стадии 3.

[0045] Измерение α -GalCer с использованием ЖХ-МС/МС можно проводить, например, методом ионизации α -GalCer на ионы-предшественники и ионы-продукты методом ионизации электрораспылением. Колонка и состав подвижной фазы для использования в жидкостной хроматографии в ЖХ-МС/МС могут представлять собой любую комбинацию колонки и подвижной фазы при условии, что используемая комбинация позволяет отделить α -GalCer от компонентов клеточного происхождения и позволяет различить α -GalCer от компонентов клеточного происхождения с использованием MC/MC.

[0046] В одном варианте осуществления количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, находится в диапазоне от 3,9 нг до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток. В одном варианте осуществления количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, может находиться в диапазоне от 10 до 275 нг, от 10 до 140 нг или от 10 до 100 нг в расчете на 1×10^6 клеток.

[0047] «3. Лечение или профилактика рака с использованием aAVC»

Способ лечения или профилактики по настоящему изобретению может включать введение субъекту таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность aAVC, для введения человеку, представляет собой заранее определенную дозу.

[0048] В одном варианте осуществления способ лечения или профилактики по настоящему изобретению отличается тем, что aAVC вводят субъекту таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность aAVC, для введения человеку, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

[0049] В одном варианте осуществления разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность аAVC, для введения человеку, может находиться в конкретном числовом диапазоне. Конкретный числовой диапазон может представлять собой числовой диапазон, входящий в диапазон от 1,7 нг до 275 нг (т.е. числовой диапазон от верхнего предельного значения 275 нг или менее до нижнего предельного значения 1,7 нг или более) на кг массы тела человека. Числовой диапазон имеет, например, числовое значение 275 нг или менее, 270 нг или менее, 260 нг или менее, 250 нг или менее, 240 нг или менее, 238 нг или менее, 230 нг или менее, 220 нг или менее, 160 нг или менее, 150 нг или менее, 190 нг или менее, 170 нг или менее, 160 нг или менее, 150 нг или менее, 140 нг или менее, 130 нг или менее, 120 нг или менее, 100 нг или менее,

90 нг или менее, 80 нг или менее, 70 нг или менее, 66 нг или менее, 60 нг или менее, 50 нг или менее, 47 нг или менее, 40 нг или менее, 36 нг или менее, 30 нг или менее, 24 нг или менее, 20 нг или менее, 19 нг или менее, 18 нг или менее, 17 нг или менее, 16 нг или менее, 15 нг или менее, 14 нг или менее, 13 нг или менее, 12 нг или менее, 11 нг или менее, 10 нг или менее, 9 нг или менее, 8 нг или менее, 7 нг или менее, 6,6 нг или менее, 5 нг или менее, 4,7 нг или менее, 4 нг или менее, 3,6 нг или менее, 3 нг или менее или 2 нг или менее в качестве верхнего предельного значения, и числовое значение 270 нг или более, 260 нг или более, 250 нг или более, 240 нг или более, 238 нг или более, 230 нг или более, 220 нг или более, 210 нг или более, 200 нг или более, 190 нг или более, 180 нг или более, 170 нг или более, 160 нг или более, 150 нг или более, 140 нг или более, 130 нг или более, 120 нг или более, 110 нг или более, 100 нг или более, 90 нг или более, 80 нг или более, 70 нг или более, 66 нг или более, 60 нг или более, 50 нг или более, 47 нг или более, 40 нг или более, 36 нг или более, 30 нг или более, 24 нг или более, 20 нг или более, 19 нг или более, 18 нг или более, 17 нг или более, 16 нг или более, 15 нг или более, 14 нг или более, 13 нг или более, 12 нг или более, 11 нг или более, 10 нг или более, 9 нг или более, 8 нг или более, 7 нг или более, 6,6 нг или более, 6 нг или более, 5 нг или более, 4,7 нг или более, 4 нг или более, 3,6 нг или более, 3 нг или более, 2,4 нг или более, 2 нг или более, или 1,7 нг или более в качестве нижнего предельного значения. Конкретный числовой диапазон может представлять собой числовой диапазон, входящий в один или более диапазонов, выбранных из группы, состоящей, например, из диапазона от 1,7 нг до 50 нг, диапазона от 50 нг до 100 нг, диапазона от 100 нг до 150 нг, диапазона от 150 нг до 200 нг, диапазона от 200 нг до 275 нг, диапазона от 1,7 нг до 238 нг, диапазона от 1,7 нг до 170 нг, диапазона от 6,6 нг до 238 нг, или диапазона от 6,6 нг до 170 нг.

[0050] В одном варианте осуществления количество α-GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, для введения человеку, можно определить, используя относительное количество NKT-клеток в клетках селезенки субъекта после введения в качестве показателя. Полагается, что повышенная доля NKT-клеток в клетках селезенки усиливает эффект от введения.

[0051] В одном варианте осуществления количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, для введения человеку, находится в диапазоне от 3,9 нг до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток. В одном варианте осуществления количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, для введения человеку, может находиться в диапазоне от 10 до 275 нг, от 10 до 140 нг или от 10 до 100 нг в расчете на 1×10^6 клеток.

[0052] аAVC можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении или профилактике рака, с использованием метода, известного специалистам в данной области. В случае введения аAVC субъекту, аAVC можно вводить субъекту в форме фармацевтической композиции, содержащей аAVC и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтическую композицию, содержащую аAVC, можно приготовить обычно используемым способом с использованием эксципиента, обычно используемого в данной области, т.е. фармацевтического эксципиента, фармацевтического носителя и т.п.

Для формуляции фармацевтической композиции можно использовать эксципиент, носитель, добавку и т.п., подходящие для ее лекарственной формы, в фармацевтически приемлемом диапазоне. Примеры лекарственной формы фармацевтической композиции включают средства для парентерального введения, такие как инъекции и инфузии.

[0053] Примеры рака, на который направлено лечение или профилактика по изобретению, включают, не ограничиваясь ЭТИМ: заболевания крови, такие как острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому, множественную миелому и Т-клеточную лимфому; солидный рак, такой как миелодиспластический синдром, аденокарциному, плоскоклеточный рак, аденосквамозную карциному, анапластический рак, крупноклеточный рак, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, мезотелиому, рак кожи, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак влагалища, рак шеи, рак головы и шеи, рак матки, рак шейки матки, рак печени, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак почки, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак толстого кишечника, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак тонкого кишечника, рак желудка, рак пищевода, рак яичка, рак яичника, рак мочевого пузыря и опухоль головного мозга; рак костной ткани, хрящевой ткани, жировой ткани, мышечной ткани, сосудистой ткани и кроветворной ткани; саркомы, такие как хондросаркома, саркома Юинга, злокачественная гемангиоэндотелиома, злокачественная шваннома, остеосаркома и саркома мягких тканей; и бластомы, такие как гепатобластома, медуллобластома, нефробластома, нейробластома, панкреатобластома, плевропульмональная бластома и ретинобластома.

[0054] Дозу aAVC для человека и количество ее доз можно соответствующим образом скорректировать в соответствии с типом, локализацией и тяжестью рака, возрастом, массой тела и состоянием субъекта, подлежащего лечению, и т. д. Доза aAVC может быть установлена на произвольном количестве в диапазоне, например, от 1×10^3 клеток/кг до 1×10^8 клеток/кг на дозу для субъекта. В одном варианте осуществления доза аAVC составляет 1.7×10^3 клеток/кг, 1.7×10^4 клеток/кг, 1.7×10^5 клеток/кг или 1.7×10^6 клеток/кг. В одном варианте осуществления доза aAVC может быть установлена на произвольном количестве в диапазоне от 6.2×10^3 клеток/кг до 7.0×10^7 клеток/кг. В этом контексте нижним предельным значением является число клеток на кг массы тела человека, когда клетки, содержащие α-GalCer, загруженные в количестве 275 нг/10⁶ клеток, вводят таким образом, что однократная доза 1,7×10³ клеток/кг, загруженная на клеточную поверхность, составляет 1,7 нг/кг. Верхнее предельное значение представляет собой количество клеток на кг массы тела человека, когда клетки, содержащие α-GalCer, загруженный в количестве 3,9 нг/106 клеток, вводят таким образом, что однократная доза α-GalCer, загруженного на клеточную поверхность, составляет 275 нг/кг. В одном варианте осуществления доза aAVC может находиться в конкретном числовом диапазоне. Конкретный числовой диапазон может представлять собой числовой диапазон, входящий в диапазон от 6.2×10^3 клеток/кг до 7.0×10^7 клеток/кг (т. е. числовой диапазон от верхнего

предельного значения 7.0×10^7 клеток/кг или менее до нижнего предельного значения 6.2×10^3 клеток/кг и более). Числовой диапазон имеет, например, числовое значение $7,0\times10^7$ клеток/кг или менее, $6,0\times10^7$ клеток/кг или менее, $5,0\times10^7$ клеток/кг или менее, $4,0\times10^7$ клеток/кг или менее, $3,0\times10^7$ клеток/кг или менее, $2,0\times10^7$ клеток/кг или менее, 1.7×10^7 клеток/кг или менее, 1.3×10^7 клеток/кг или менее, 1.0×10^7 клеток/кг или менее, $9,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $8,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $7,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $6,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $5,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $4,3\times10^6$ клеток/кг или менее, $4,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $3,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $2,7\times10^6$ клеток/кг или менее, $2,0\times10^6$ клеток/кг или менее, $1,7\times10^6$ клеток/кг или менее, или $1,0\times10^6$ клеток/кг или менее в качестве его верхнего предельного значения, и числовое значение 1,0×10⁴ клеток/кг и более, 1.7×10^4 клеток/кг и более, 2.0×10^4 клеток/кг и более, 3.0×10^4 клеток/кг и более, $4,0\times10^4$ клеток/кг и более, $4,4\times10^4$ клеток/кг и более, $5,0\times10^4$ клеток/кг и более, $6,0\times10^4$ клеток/кг и более, 6.6×10^4 клеток/кг и более, 7.0×10^4 клеток/кг и более, 8.1×10^4 клеток/кг и более, 9.0×10^4 клеток/кг и более, 1.0×10^5 клеток/кг и более, 1.7×10^5 клеток/кг и более, $2,0\times10^5$ клеток/кг и более, $3,0\times10^5$ клеток/кг и более, $3,2\times10^5$ клеток/кг и более, $4,0\times10^5$ клеток/кг и более, 5.0×10^5 клеток/кг и более, 6.0×10^5 клеток/кг и более, 6.6×10^5 клеток/кг и более, 7.0×10^5 клеток/кг и более, 8.0×10^5 клеток/кг или более, или 9.0×10^5 клеток/кг или более в качестве нижнего предельного значения. Конкретный числовой диапазон может представлять собой числовой диапазон, входящий в один или более диапазонов, выбранных из группы, состоящей, например, из диапазонов от 1,7×10³ клеток/кг до $1,7\times10^6$ клеток/кг, от $1,7\times10^3$ клеток/кг до $1,7\times10^5$ клеток/кг, от $1,7\times10^3$ клеток/кг до 1.7×10^4 клеток/кг, от 1.7×10^4 клеток/кг до 1.7×10^6 клеток/кг, от 1.7×10^4 клеток/кг до 1.7×10^5 клеток/кг, от 1.7×10^5 клеток/кг до 1.7×10^6 клеток/кг, от 6.6×10^4 клеток/кг до $1,7\times10^7$ клеток/кг, от $1,7\times10^5$ клеток/кг до $2,7\times10^7$ клеток/кг, от $6,6\times10^5$ клеток/кг до $1,7\times10^7$ клеток/кг, от $8,1\times10^4$ клеток/кг до $1,3\times10^7$ клеток/кг, от $3,2\times10^5$ клеток/кг до $8,0\times10^6$ клеток/кг, от $4,4\times10^4$ клеток/кг до $7,0\times10^6$ клеток/кг, от $2,6\times10^5$ клеток/кг до $4,3\times10^6$ клеток/кг, от $1,7\times10^4$ клеток/кг до $2,7\times10^6$ клеток/кг и от $6,6\times10^4$ клеток/кг до $1,7 \times 10^6$ клеток/кг.

[0055] В отношении способа введения аAVC человеку, то аAVC можно вводить, например, внутривенной, интратуморальной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной или внутриартериальной инъекцией или инфузией.

[0056] Способ лечения или профилактики по настоящему изобретению можно использовать в комбинации с дополнительным способом лечения рака. Примеры дополнительных способов лечения рака включают хирургическое вмешательство, лучевую терапию, трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток и терапию другими противоопухолевыми агентами.

[0057] «Фармацевтическая композиция и т.д. по настоящему изобретению»

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака, содержащей клетки человеческого происхождения. Фармацевтическая композиция содержит клетку человеческого происхождения,

экспрессирующую экзогенный или эндогенный CD1d и содержащую α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность, и вводится человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность, для введения человеку, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека. Клетка человеческого происхождения может дополнительно экспрессировать один или более экзогенных или эндогенных опухолевых антигенов. Настоящее изобретение также относится к применению клетки человеческого происхождения для производства фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака, где клетка экспрессирует экзогенный или эндогенный CD1d и содержит α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность, и композицию вводят человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность, для введения человеку, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы Клетка тела человека. человеческого происхождения может дополнительно экспрессировать один или более экзогенных или эндогенных опухолевых антигенов. Настоящее изобретение также относится к клетке человеческого происхождения для лечения или профилактики рака, где клетка экспрессирует экзогенный или эндогенный CD1d и содержит α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность, и эту клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность, для введения человеку, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека. Клетка человеческого происхождения может дополнительно экспрессировать один или более экзогенных или эндогенных опухолевых антигенов.

[0058] Варианты осуществления изобретения, касающиеся используемой клетки (aAVC) и способа ее получения, и ее применения в лечении или профилактике рака и т. д. в фармацевтической композиции, то применение и клетка по настоящему изобретению, упомянутые выше, описаны выше в разделе «Способ лечения или профилактики рака по настоящему изобретению».

[0059] «Способ получения фармацевтической композиции и т.п. по настоящему изобретению»

Настоящее изобретение также относится к способу получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака, включающей клетку человеческого происхождения. Способ получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может включать способ, включающий: получение клетки человеческого происхождения, которая экспрессирует экзогенный или эндогенный CD1d и содержит α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность; и упаковку клетки в виде фармацевтической композиции, которую вводят человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека. Способ может дополнительно включать стадию остановки роста клетки человеческого происхождения с использованием такого метода, как воздействие излучением. В одном варианте осуществления способ получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может представлять собой способ, включающий: получение клетки человеческого происхождения, которая

экспрессирует экзогенный или эндогенный CD1d и содержит α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность; отбор клетки или определение числа клеток для упаковки в виде фармацевтической композиции с использованием в качестве показателя количества а-GalCer, загруженного на клеточную поверхность; и упаковку отобранной или определенной клетки для получения фармацевтической композиции. В данном варианте осуществления общее количество α-GalCer, загруженное на поверхность клеток, содержащихся в фармацевтической композиции, может находиться в числовом диапазоне, определяемом умножением произвольного числового значения от 1,7 нг до 275 нг на среднюю массу тела человека. Способ получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может дополнительно включать способ измерения количества α-GalCer, загруженного на клеточную поверхность, описанный в разделе «Способ измерения количества α-GalCer, загруженного на клетку». Способ получения фармацевтической композиции по настоящему изобретению может дополнительно включать: отбор клеточной популяции, в которой количество α-GalCer, загруженного на клетку, находится в определенном числовом диапазоне; и упаковку выбранной клеточной популяции в виде фармацевтической композиции. Количество α-GalCer, загруженного на клетку, может находиться в диапазоне, например, от 3,9 нг до 275 нг, от 10 до 275 нг, от 10 до 140 нг или от 10 до 100 нг в расчете на 1×10^6 клеток. Полученную фармацевтическую композицию вводят человеку в вышеуказанной дозе.

[0060] «Способ измерения количества α-GalCer, загруженного на клетку»

Настоящее изобретение также относится к следующему способу измерения количества α-GalCer, загруженного на клетки:

способу измерения количества α -GalCer, загруженного на клетки, где клетки экспрессируют CD1d и содержат α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность, где способ включает следующие стадии:

приготовление клеточных экстрактов клеток; и

подвергание клеточных экстрактов масс-спектрометрии (MC) для измерения количества α-GalCer в экстрактах.

[0061] В одном варианте осуществления масс-спектрометрия (МС) представляет собой жидкостную хроматографию-тандемную масс-спектрометрию (ЖХ-МС/МС).

[0062] В одном варианте осуществления клетки, используемые в данном способе, представляют собой клетки человеческого происхождения, которые экспрессируют экзогенный или эндогенный CD1d и содержат α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность (aAVC). В одном варианте осуществления клетки, используемые в данном способе, представляют собой клетки человеческого происхождения, экспрессируют экзогенный или эндогенный CD1d и один или более экзогенных или эндогенных опухолевых антигенов и содержат α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность (aAVC). В одном варианте осуществления клетки, используемые в этом представляют собой клетки человеческого происхождения, экспрессируют экзогенный CD1d и один или более экзогенных опухолевых антигенов и содержат α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность (aAVC).

[0063] Конкретные примеры, на которые следует ссылаться, будут предоставлены здесь для дальнейшего понимания настоящего изобретения. Однако эти примеры приведены для иллюстративных целей и не ограничивают настоящее изобретение.

Примеры

[0064] Пример 1-1: получение aAVC-WT1

Лентивирусы получали с использованием плазмид, несущих гены WT1, CD1d и Tet3G (обратный тетрациклиновый трансактиватор) соответственно. Посредством введения этих генов в клетки FreeStyleTM 293-F (Thermo Fisher Scientific, номер по каталогу R79007) с использованием указанного лентивируса, несущего каждый из генов, была сконструирована aAVC, экспрессирующая CD1d и WT1 и загруженная α -GalCer на клеточную поверхность.

[0065] (1) Конструирование плазмид для получения лентивирусов

Ген, содержащий добавленную на 5'-конце последовательность узнавания XhoI и добавленную на 3'-конце последовательность узнавания NotI в гене WT1 (SEQ ID NO: 1), встраивали в сайт XhoI-NotI плазмиды pLVSIN-CMV Pur (Takara Bio Inc., номер по pLVSIN-CMV-WT1. каталогу 6183) для конструирования плазмиды последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1, получали кодон-оптимизацией для клеток человека через сервис искусственного синтеза генов Thermo Fisher Scientific Inc. на основе аминокислотной последовательности изоформы D белка опухоли Вильмса (референсная последовательность NCBI: NP 077744.3). Плазмиду pLVSIN-CMV-WT1 расщепляли рестриктазами ClaI и EcoRI для удаления промотора CMV. Затем разрезанные концы «затупляли» ДНК-полимеразой Т4 (Toyobo Co., Ltd., номер по каталогу TPL-101). Реакцию лигирования проводили с использованием набора для лигирования ДНК (Takara Віо Іпс., номер по каталогу 6023) для конструирования плазмиды pLVSIN-Δ-WT1. Промотор TRE3G, вырезанный из pTRE3G (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631173) с использованием рестриктаз EcoRI и Sall, вставляли в сайт EcoRI-XhoI плазмиды pLVSIN-Δ-WT1 для конструирования плазмиды pLVSIN-TRE3G-WT1. Плазмиду pLVSIN-TRE3G-WT1 расщепляли рестриктазами BamHI и MluI для удаления промотора PGK и гена устойчивости к пуромицину. Затем разрезанные концы плазмиды «затупляли» ДНКполимеразой Т4. Реакцию лигирования проводили с использованием набора для лигирования ДНК для конструирования плазмиды pLVSIN-TRE3G-WT1 Δ pur.

[0066] Плазмиду pLVSIN-CMV Pur расщепляли рестриктазами XhoI и MluI для удаления промотора PGK и гена устойчивости к пуромицину. Ген CD1d (SEQ ID NO: 3) амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров с последовательностями, комплементарными 15 нуклеотидам на обоих концах сайта XhoI-MluI плазмиды соответственно. Амплифицированный ген CD1d встраивали в вышеописанную расщепленную плазмиду с использованием набора для клонирования In-Fusion® HD (Такага Віо Іпс., номер по каталогу 639648) для конструирования плазмиды pLVSIN-CMV-CD1dΔpur. Ген с последовательностью SEQ ID NO: 3 получали кодон-оптимизацией

для клеток человека с помощью сервиса искусственного синтеза генов Thermo Fisher Scientific Inc. на основе аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 4) предшественника антигенпрезентирующего гликопротеина CD1d изоформы 1 (референсная последовательность NCBI: NP 001757.1).

[0067] Ген Tet3G амплифицировали из плазмиды pCMV-Tet-On 3G (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631335) с использованием ПЦР. Амплифицированный ген встраивали в сайт XhoI-MluI плазмиды pLVSIN-CMV Pur с использованием набора для клонирования In-Fusion® HD для конструирования плазмиды pLVSIN-CMV-Tet3G Δ pur.

[0068] (2) Получение лентивируса

Лентивирус, загруженный WT1, лентивирус, загруженный CD1d, и лентивирус, загруженный Tet3G, получали с использованием плазмиды pLVSIN-TRE3G-WT1 Δ pur, плазмиды pLVSIN-CMV-CD1d Δ pur и плазмиды pLVSIN-CMV-Tet3G Δ pur, полученной на стадии (1).

[0069] Смешивали 30 мкг плазмиды pLVSIN-TRE3G-WT1Δpur и 30 мкл лентивирусной упаковочной смеси ViraPower (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу К497500). К этому добавляли среду Opti-MEMTM I с пониженным содержанием сыворотки (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 31985-070) для доведения до 1 мл и перемешивали, и смесь выдерживали в течение 5 мин (А). 60 мкл реагента для трансфекции ДНК in vitro PEIpro® (Polyplus-transfection SE, номер по каталогу 115-010) и 940 мкл среды Opti-MEMTM I с пониженным содержанием сыворотки смешивали и выдерживали в течение 5 мин (В). (А) и (В) смешивали и оставляли при комнатной температуре на 15 мин. Затем проводили введение гена посредством добавления всего количества к клеткам 293T (ATCC номер по каталогу CRL-3216), инокулированным в колбу Falcon® со скошенным горлышком и вентилируемой крышкой емкостью 800 мл (Corning Inc., номер по каталогу 353138). Инокуляцию клеток 293T проводили за день до введения гена. Клетки культивировали С в условиях при 37° и 5% CO₂ в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 10569-010), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (SAFC Biosciences, номер по каталогу 12007C (облученный у-лучами продукт)) и 0,1% гентамицина (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 15750-060). После введения гена клетки культивировали в течение 2 дней. Культуральный лентивирус, WT1, супернатант, содержащий загруженный геном выделяли центрифугированием культуральной среды при 230× g при комнатной температуре в течение 5 мин. Супернатант фильтровали через фильтр 0,22 мкм (Merck KGaA, номер по каталогу SLGV033RS). Раствор $4 \times \Pi \Im \Gamma$ (32% полиэтиленгликоль) BioUltra, 6000 (Merck KGaA, номер по каталогу 81253-250G), 0,4 M NaCl (Kanto Chemical Co., Inc., номер по каталогу 37144-02) и 0,04 M HEPES (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 15630-080)) добавляли к нему в количестве, составляющем 1/3 от количества супернатанта, перемешивали и оставляли на ночь при 4°C. Смесь центрифугировали при $2500 \times$ g при 4°C в течение 30 мин и супернатант удаляли. Супернатант полностью удаляли после дополнительного центрифугирования при 2500× g при 4°C в течение 30 мин. Осадки суспендировали в соответствующем количестве среды Opti-MEMTM I с пониженным содержанием сыворотки. Выделенный культуральный супернатант концентрировали в 30 раз для получения лентивируса, загруженного WT1.

[0070] Лентивирус, загруженный Tet3G, получали практически по той же методике, описанной выше, с использованием плазмиды pLVSIN-CMV- $Tet3G\Delta$ риг. Период культивирования после введения гена устанавливали на 2 днях или 3 днях. Выдерживание после смешивания с раствором $4 \times \Pi \Im \Gamma$ проводили при $4 ^{\circ} C$ в течение ночи или 4 дней. В качестве конечной суспензионной среды использовали среду для экспрессии FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 12338018).

[0071] Смешивали 12 мкг плазмиды pLVSIN-CMV-CD1dApur и 36 мкл лентивирусной упаковочной смеси ViraPower. К этому добавляли OptiProTM SFM (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 12309-019) для доведения до 6 мл и перемешивали, и смесь выдерживали в течение 5 мин (А-2). 144 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 CD (Thermo Fischer Scientific Inc., номер по каталогу 12566-014) и 6 мл OptiProTM SFM смешивали и оставляли на 5 мин (B-2). А-2 и B-2 смешивали и выдерживали при комнатной температуре на 20 мин. Затем проводили введение гена добавлением всего количества к клеткам 293FT (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу R70007), инокулированным в колбу Falcon® со скошенным горлышком и вентилируемой крышкой емкостью 800 мл. Среду, используемую для культивирования клеток 293FT, готовили добавлением G418 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 10131-027) и раствора незаменимых аминокислот MEM (100X) (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 11140050) концентрации 500 мкг/мл и 0,1 мМ, соответственно, в среду DMEM, содержащую 10% фетальной телячьей сыворотки (SAFC Biosciences, номер по каталогу 12007С (облученный у-лучами продукт)) и 0,1% гентамицина. После введения гена клетки культивировали в течение 2 дней. Культуральный супернатант, содержащий лентивирус, загруженный геном CD1d, извлекали центрифугированием культуральной среды при 540× g при 4°C в течение 10 мин. Супернатант фильтровали через фильтр 0,44 мкм (Merck KGaA, номер по каталогу SLHV033RS). К раствору добавляли раствор для осаждения вируса PEG-itTM (5x) (System Biosciences, LLC, номер по каталогу LV825A-1) в количестве 1/5 от количества супернатанта, перемешивали и выдерживали в течение ночи при 4°C. Смесь центрифугировали при 1500× g при 4°C в течение 30 мин для удаления супернатанта и повторно центрифугировали при 1500× g при 4°C в течение 5 мин для полного удаления супернатанта. Осадки суспендировали в соответствующем количестве среды для экспрессии FreeStyle 293. Выделенный культуральный супернатант концентрировали в 75 раз для получения лентивируса, загруженного CD1d.

[0072] (3) Получение клетки FreeStyle 293F_WT1_CD1d_Tet3G

Клетки FreeStyleTM 293-F последовательно инфицировали 3 типами лентивирусов, приготовленных на стадии (2), с получением клеток FreeStyle 293F_WT1_CD1d_Tet3G. Клетки FreeStyleTM 293-F культивировали в среде для экспрессии FreeStyle 293,

содержащей 0,1% гентамицина. Готовили клетки FreeStyle $^{\text{TM}}$ 293-F в концентрации 1×10^6 клеток/мл и инокулировали в объеме 1 мл/лунку в 12-луночный планшет Falcon®, мультилуночный планшет для культивирования клеток с плоским дном и крышкой (Corning Inc., номер по каталогу 353043; в дальнейшем именуемый 12-луночным планшетом). В каждую лунку добавляли по 50 мкл лентивируса, загруженного WT1, и по 100 мкл лентивируса, загруженного Tet3G, приготовленных на стадии (2). После центрифугирования при 540 ×g при комнатной температуре в течение 30 мин клетки осторожно суспендировали пипетированием и культивировали при встряхивании. Через 3 дня клетки пассировали из 12-луночного планшета в поликарбонатную колбу Эрленмейера емкостью 125 мл Corning® с вентилируемой крышкой (Corning Inc., номер по каталогу 431143; далее относится к колбе Эрленмейера емкостью 125 мл), затем пассировали через 3-4-дневные интервалы, и культивировали в течение 11 дней. Данные клетки снова инокулировали в 12-луночный планшет. В каждую лунку добавляли 100 мкл лентивируса, загруженного CD1d, приготовленного на стадии (2). Второе инфицирование лентивирусом проводили по тем же методикам, что и первое. Через 1 день клетки пассировали из 12-луночного планшета в колбу Эрленмейера емкостью 125 мл, затем пассировали с интервалом 3 или 4 дня и культивировали в течение 10 дней. Полученные клетки использовали в качестве клеток FreeStyle 293F WT1 CD1d Tet3G.

[0073] (4) Клонирование

Клонирование отдельных клеток проводили методом лимитирующих разведений из клеток FreeStyle 293F WT1 CD1d Tet3G, полученных на стадии (3). Отбирали клоны, стабильно экспрессирующие все гены. Клетки инокулировали из расчета 1 клетка/лунку в 96-луночный планшет и пассировали по мере пролиферации клеток. Уровни экспрессии белка WT1 и белка CD1d в пролиферирующих клетках измеряли с помощью ELISA для WT1 и с помощью проточной цитометрии для CD1d для отбора клонов, стабильно экспрессирующих белки WT1 и CD1d. Экспрессию WT1 индуцировали с помощью системы Tet-On посредством добавления в среду доксициклина (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631311) с конечной концентрацией 100 нг/мл и, проводили оценку. Измерение с помощью ELISA проводили в соответствии с общей процедурой постановки сэндвич ELISA с использованием антитела против опухоли Вильмса, клон NT 6F-H2 (Merck KGaA, номер по каталогу MAB4234-C) в качестве антитела для иммобилизации, анти-WT1 антитела (Wuxi AppTec Co., Ltd., номер по каталогу AP11964c) в качестве первичного антитела и IgG кролиьего антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена (R&D Systems, Inc., номер по каталогу HAF008), в качестве вторичного антитела. Измерение с помощью проточной цитометрии выполняли с использованием мышиного антитела АРС против человеческого CD1d (BD Biosciences, номер по каталогу 563505) и FACSVerseTM (BD Biosciences). Отобранные клоны использовали в качестве клеток-предшественников aAVC-WT1.

[0074] (5) Получение aAVC-WT1, отличающейся количеством загруженного α -GalCer

Добавлением различных концентраций α-GalCer (синтез которого проводили в производство) Juzen Chemical Corp. согласно соглашению на клеткамaAVC-WT1 предшественникам культивированием клеток получали aAVC, И отличающиеся количеством загруженного α-GalCer (также называемые aAVC-WT1).

[0075] Клетки-предшественники аAVC-WT1 культивировали и добавляли доксициклин в конечной концентрации 100 нг/мл и раствор α -GalCer в конечной концентрации 56 нг/мл, 167 нг/мл, 500 нг/мл, 1500 нг/мл или 3000 нг/мл в среду для стимулирующей обработки клеток под действием α -GalCer. Культивирование клеток-предшественников аAVC-WT1 с добавлением раствора α -GalCer с концентрацией 1500 нг/мл проводили независимо с тремя различными объемами культуры. Раствор α -GalCer готовили способом, соответствующим описанному ниже в примере 2(1). Через 2 суток после добавления α -GalCer клетки выделяли центрифугированием, промывали, концентрировали и облучали рентгеновскими лучами в дозе 30, 40 или 100 Гр с использованием рентгеновского аппарата MBR-1520P-3 или MBR-1520R-4 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.) для получения аAVC-WT1.

[0076] Пример 1-2: получение аАVC(3Т3)-WT1 мышиного типа

аAVC мышиного типа (также относящуюся к аAVC(3T3)-WT1) получали введением мРНК гена WT1 и гена CD1d в мышиные клетки NIH/3T3 (ATCC, номер по каталогу CRL-1658) и добавлением α -GalCer (синтезирован в Juzen Chemical Corp. согласно соглашению на производство).

[0077] Ген WT1, вырезанный из pcDNA3-ATG-WT1, описанный в WO2013/018778, с использованием рестриктаз HindIII и EcoRI, вставляли в сайт HindIII-EcoRI плазмиды pGEM-4Z (Promega Corp., номер по каталогу P2161) для получения плазмиды pGEM-4Z-WT1. Ген мышиного CD1d, состоящий из нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5 (синтезирован посредством кодон-оптимизации для клеток мыши с помощью сервиса искусственного синтеза генов Thermo Fisher Scientific Inc. на основе аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 6) антиген-презентирующего гликопротеина CD1d1, UniProt: P11609-1, встраивали в сайт HindIII-BamHI плазмиды pGEM-4Z для конструирования плазмиды pGEM-4Z-mCD1d. Плазмиду pGEM-4Z-WT1 и плазмиду pGEM-4Z-mCD1d расщепляли и линеаризовали с использованием EcoRI и BamHII, соответственно. мРНК WT1 и мРНК CD1d получали с использованием плазмид в качестве матриц с использованием набора для транскрипции mMESSAGE mMACHINETM T7 ULTRA (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу AMB13455). Клетки NIH/3T3 культивировали в течение 2 дней в среде Игла, модифицированной по способу Дульбекко (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 10569), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки с добавлением 500 нг/мл α-GalCer (синтезирован в Juzen Chemical Corp. согласно соглашению на производство). Добавляли мРНК WT1 и мРНК CD1d к клеточной суспензии и проводили электропорацию (режим, который обеспечивает раскрытие клеточных пор: напряжение: 150 В, длительность импульса: 8 мс, интервал между импульсами: 50 мс, количество импульсов: 2, затухание импульсов: 40%, полярность: +;

режим, который обеспечивает необходимый уровень трансфекции: напряжение: 20 В, длительность импульса: 50 мс, интервал между импульсами: 50 мс, количество импульсов: ±5, затухание импульсов: 10%, полярность: +/-) с использованием электропоратора NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.). Электропорированные клетки извлекали и облучали рентгеновскими лучами в дозе 30 Гр с использованием рентгеновского аппарата MBR-1520R-3 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.) или MBR-1520R-4 для получения аAVC(3T3)-WT1.

[0078] Пример 2: измерение концентрации α -GalCer, загруженного на aAVC-WT1 и aAVC(3T3)-WT1

(1) Приготовление стандартного раствора α-GalCer

28 г сахарозы (Merck KGaA, номер по каталогу S7903) и 3,75 г L-гистидина (Merck KGaA, номер по каталогу H8000) добавляли к 400 мл воды для инъекций (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу A12873-02) и растворяли при нагревании на водяной бане при постоянной температуре 80°С. К раствору добавляли 100 мг α-GalCer и 25 г 10% полисорбата 20 (MP Biomedicals, LLC, номер по каталогу 194724) и смесь нагревали в течение более 1 ч на бане с постоянной температурой 80°С. После подтверждения растворения твердого вещества в растворе количество доводили до 500 г добавлением воды для инъекций. Данный раствор использовали в качестве раствора α-GalCer с концентрацией 200 мкг/мл. Раствор α-GalCer с концентрацией 200 мкг/мл разбавляли раствором разбавителя (10% воды и 90% подвижной фазы В (70% этанола, 29,5% метанола и 0,5% муравьиной кислоты)) для приготовления растворов α-GalCer, имеющих концентрации 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл или 2,5 нг/мл, которые использовали в качестве стандартных растворов α-GalCer.

[0079] (2) Приготовление клеточного экстракта

1 мл или 0,25 мл воды Milli-Q добавляли к 1×10^6 клеткам aAVC, полученным стимулирующей обработкой с использованием различных концентраций α -GalCer, как описано в примере 1. Клетки гомогенизировали в течение 20 с с использованием ультразвукового гомогенизатора (SMT Co., Ltd., номер по каталогу UH-50). 900 мкл подвижной фазы В добавляли к 100 мкл клеточного гомогената и смесь перемешивали в течение более 10 мин. После центрифугирования при $10000 \times g$ в течение 5 мин 250 мкл супернатанта собирали в полипропиленовый флакон с завинчивающейся крышкой (GL Sciences Inc., номер по каталогу 1030-61024) с получением клеточных экстрактов.

[0080] (3) Анализ ЖХ-МС/МС

Стандартные растворы α -GalCer, приготовленные на стадии (1), и клеточные экстракты, приготовленные на стадии (2), анализировали с помощью мониторинга множественных реакций ЖХ-МС/МС. Измерение проводили с числом измерений, равным 1 для стандартных растворов α -GalCer, и равным 6, 3 или 1 для клеточных экстрактов, как показано в таблице 1 (5). В качестве ЖХ использовали систему для ЖХ серии 1200 (Agilent Technologies, Inc.), и в качестве МС использовали систему 6410 Triple Quad LC-MS (Agilent Technologies, Inc., номер по каталогу G6410B). Образцы разделяли с помощью

ЖХ. 10 мкл каждого из стандартных растворов α-GalCer и клеточных экстрактов наносили на колонку Ассисоге-150-C4 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 16526-103030) и образцы разделяли с использованием подвижной фазы А (0,1% муравьиной кислоты) и подвижной фазы Б (этанол 70%, метанол 29,5%, муравьиная кислота 0,5%) в градиенте от 60% до 100% подвижной фазы В. Скорость потока в колонке составляла 0,4 мл/мин, температура колонки равнялась 40°С. Разделенные растворы последовательно вводили в МС, и соединения в растворах ионизировали методом ионизации электрораспылением. 858,7 [m/z] был выбран в качестве иона-предшественника α-GalCer из полученных ионов. Данный ион-предшественник подвергали дополнительной деградации для детектирования 696,7 [m/z] в качестве иона-продукта α-GalCer. Значения, определенные заранее путем анализа стандартных растворов α-GalCer с помощью ЖХ-МС/МС, использовались для иона-предшественника и иона-продукта.

[0081] (4) Анализ

α-GalCer Концентрацию определяли количественно c использованием программного обеспечения для анализа (Agilent Technologies, Inc., Agilent MassHunter Quantitative Analysis). Время удерживания α-GalCer определяли по результатам анализа стандартных растворов α-GalCer, и было подтверждено, что анализируемые образцы демонстрируют аналогичное время удерживания, и количество α-GalCer в каждом из образцов анализировали по площади пика. Калибровочную кривую строили по результатам анализа стандартных растворов α-GalCer, приготовленных на стадии (1), и проводили количественный анализ представляющих интерес образцов. Для построения калибровочной кривой использовали результаты анализа, полученные из 6 точек 1000 нг/мл, 500 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 10 нг/мл и 5 нг/мл или из 4-5 точек из 6 точек 500 нг/мл, 100 нг/мл, 50 нг/мл, 10 нг/мл, 5 нг/мл и 2,5 нг/мл.

[0082] (5) Результаты анализа содержания α-GalCer

Результаты анализа количества α -GalCer, загруженного на aAVC(3T3)-WT1 или aAVC-WT1, с использованием ЖХ-МС/МС, приведены в таблице ниже.

В таблице 1 три значения, показанные при внесенной концентрации α -GalCer, равной 1500 нг/мл, указывают количество α -GalCer, загруженного на клетки, полученное в трех независимых экспериментах с разными масштабами культивирования.

Таблица 1

Тип	Добавленная концентрация α- GalCer (нг/мл)	Загруженное количество $(Hr/10^6 \text{ клеток})$	Число измерений
aAVC(3T3) -WT1	500	2,4*	1
	56	3,9*	3
aAVC-WT1	167	10	3
	500	21	3

1500	39	3
1500	140	6
1500	275	6
3000	100	3

^{*}представляет «ниже, чем значение нижнего предела количественного определения», когда количество анализированных клеток составляет 10^6 клеток

[0083] Пример 3: определение дозы клеток aAVC(3T3)-WT1, проявляющей фармакологическую эффективность

Противоопухолевый эффект за счет активации NKT-клеток, опосредованной а-GalCer на aAVC(3T3)-WT1, оценивали на модели меланомы B16 с метастазами в легкие на мышах, которым внутривенно вводили опухолевые клетки. Клетки меланомы B16-F10 (ATCC, номер по каталогу CRL-6475), суспендированные в PBS, вводили по 2×10^4 клеток в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 7 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n=16 мышей в каждой группе) для воспроизведения модели меланомы В16 с метастазами в легкие при внутривенном введении опухолевых клеток. Через 3 ч после введения, aAVC(3T3)-WT1 суспендировали в растворе BICANATE Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), где загруженное количество α-GalCer составляло 2,4 нг/ 10^6 клеток (самая верхняя часть таблицы 1 в примере 2), и вводили мышам в дозах $1,7\times10^4$ клеток/кг, $1,7\times10^5$ клеток/кг или $1,7\times10^6$ клеток/кг в хвостовую вену. 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. Результаты определения выживаемости в течение 61 дней после введения B16-F10 показали, что средняя выживаемость в контрольной группе составила 29,5 дней, в то время как средняя выживаемость в группе с введением aAVC(3T3)-WT1 составила 31,5 дней для группы с введением 1.7×10^4 клеток/кг, 42,0 дня для группы с введением 1.7×10^5 клеток/кг и 37,0 дней для группы с введением $1,7\times10^6$ клеток/кг. При сравнении выживаемости с использованием лог-рангового критерия, то выживаемость в группах мышей, которым вводили aAVC(3T3)-WT1 в дозе 1.7×10^5 клеток/кг или 1.7×10^6 клеток/кг. была достоверно выше по сравнению с контрольной группой (фиг. 1). Следовательно, на данной модели было обнаружено, что aAVC(3T3)-WT1 эффективна в дозе 1.7×10^5 клеток/кг. Сообщалось, что противоопухолевый эффект клеток, загруженных α-GalCer, на данной модели ослабляется за счет дефицита NKT-клеток у мышей или истощения NKклеток (J. Immunolo.; 2007; 178: 2853-2861). Таким образом, полагается, что противоопухолевый эффект аAVC(3T3)-WT1, показанный данной опосредуется активацией NKT-клеток загруженным на них α-GalCer.

[0084] Пример 4: количество загруженного α-GalCer и активация NKT-клеток

Для установления фармакологически эффективной дозы aAVC-WT1 человеческого типа с использованием aAVC(3T3)-WT1 мышиного типа, оценивали способность активировать NKT-клетки у мышей для aAVC(3T3)-WT1 и каждой aAVC-WT1, представленной в таблице 1 в примере 2, и проводили сравнение. Дозу α -GalCer,

необходимую для проявления фармакологического эффекта, опосредованного активацией NKT-клеток при введении человеку aAVC-WT1, определяли с использованием результатов, полученных выше. Относительное количество NKT-клеток в клетках селезенки после введения aAVC(3T3)-WT1 определяли в качестве показателя способности активировать NKT-клетки.

[0085] аAVC(3T3)-WT1 или каждую аAVC-WT1, загруженную количеством с-GalCer, указанным в таблице 1 в примере 2, суспендированные в растворе BICANATE, вводили в дозах 1.7×10^4 клеток/кг, 1.7×10^5 клеток/кг или 1.7×10^6 клеток/кг в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 5 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n=3 мышей в каждой группе). 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили контрольной группе. Через 3 дня после введения мышей подвергали эвтаназии и извлекали селезенку. Клетки селезенки получали из иссеченной селезенки по общепринятой методике. NKT-клетки, включенные в клетки селезенки, окрашивали рекомбинантным мышиным растворимым слитым димером CD1d:Ig, связанным с α-GalCer (CD1d/Gal-димер, Becton, Dickinson and Company, Dickinson and Company, номер по каталогу 560089), APC-конъюгированным антимышиным IgG1 (Becton, Dickinson and Сотрапу, номер по каталогу 560089) и FITC-конъюгированным антимышиным CD19 (BioLegend, Inc., номер по каталогу 115506), и анализировали с использованием проточной цитометрии. Относительное количество NKT-клеток рассчитывали анализом доли CD1d/Gal-димер-позитивных и CD19-негативных клеток во фракции лимфоцитов на цитограмме прямого и бокового рассеяния с использованием программного обеспечения 10.2 FlowJo ver. (FlowJo, LLC). В результате была показана тенденция увеличения доли NKT-клеток в клетках селезенки в соответствии с увеличением количества α-GalCer, загруженного на aAVC-WT1, и увеличением количества введенных клеток (фиг. 2). Полученные результаты позволяют предположить, что количество введенного α-GalCer в большей степени существенно коррелирует с активацией NKT-клеток, а не с количеством введенных клеток.

[0086] Относительное количество NKT-клеток в клетках селезенки составляло 1,1% (заштрихованный столбец аAVC(3T3)-WT1 на фиг. 2), когда аAVC(3T3)-WT1 вводили в дозе $1,7\times10^5$ клеток/кг (доза, которая достоверно увеличивала выживаемость по сравнению с контрольной группой в примере 3). У мыши, которой вводили аAVC-WT1, минимальная доза α -GalCer, демонстрирующая относительное количество NKT-клеток на уровне 1,1% или более, составляла 1,7 нг/кг (фиг. 2, заштрихованный столбец аAVC-WT1 с α -GalCer 10 нг/ 10^6 клеток; и в таблице 2, когда вводили 10 нг/ 10^6 клеток α -GalCer из расчета $1,7\times10^5$ клеток/кг, вводили 1,7 нг/кг в пересчете на дозу α -GalCer). Это дает основание предположить, что доза α -GalCer 1,7 нг/кг или выше может достоверно повысить относительное количество NKT-клеток в клетках селезенки.

Даже минимальное количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность aAVC, соответствующее концентрации 3,9 нг/ 10^6 клеток, показало долю NKT-клеток на уровне 1,1% или более, если доза α -GalCer была выше 1,7 нг/кг (фиг. 2, полностью

закрашенный столбец aAVC-WT1, где количество загруженного α -GalCer составляло 3,9 нг/ 10^6 клеток). Это дает основание предположить, что желательно использовать клетки, загруженные α -GalCer в концентрации 3,9 нг/ 10^6 клеток или выше.

[0087] В таблице 2 обобщены типы клеток, количество загруженного α -GalCer, количество введенных клеток и дозы α -GalCer при введении указанных количеств введенных клеток мышам, использованные в примерах 3 и 4.

Таблица 2

TE.	Количество	Количество	Поза g-GalCer	
Тип	загруженного а-	введенных клеток	Доза α-GalCer (нг/кг)	
	GalCer (нг/10 ⁶ клеток)	(клеток/кг)		
aAVC(3T3)		$1,7\times10^4$	0,041	
-WT1	2,4*	1.7×10^5	0,41	
		1.7×10^6	4,1	
	3,9*	$1,7 \times 10^4$	0,066	
		$1,7 \times 10^5$	0,66	
		$1,7 \times 10^6$	6,6	
		$1,7\times10^4$	0,17	
	10	$1,7 \times 10^5$	1,7	
aAVC-WT1		$1,7\times10^6$	17	
		$1,7 \times 10^4$	0,36	
	21	$1,7\times10^5$	3,6	
		$1,7 \times 10^{6}$	36	
		$1,7\times10^4$	0,66	
	39	$1,7\times10^5$	6,6	
		$1,7 \times 10^6$	66	
		$1,7\times10^4$	1,7	
	100	$1,7 \times 10^5$	17	
		$1,7 \times 10^6$	170	
		$1,7 \times 10^4$	2,4	
	140	$1,7\times10^5$	24	
		$1,7\times10^6$	238	
		$1,7\times10^4$	4,7	
	275	$1,7\times10^5$	47	
		1.7×10^6	468	
		1	i	

[0088] Пример 5: оценка токсичности после однократного внутривенного введения мышам

Оценивали токсичность aAVC-WT1 (количество загруженного α-GalCer: 275 нг/10⁶ клеток) после однократного внутривенного введения мышам. Мышей-самок или мышейсамцов C57BL/6J в возрасте восьми недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) использовали в каждой группе, состоящей из пяти мышей. В качестве групп с введением было четыре группы: контрольная группа с носителем, группа с низкой дозой (1×10^6) клеток/кг), группа со средней дозой (1×10^7) клеток/кг) и группа с высокой дозой (1×10^8) клеток/кг). Pacтвор BICANATE Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) использовали в качестве носителя для приготовления раствора для введения клеток. aAVC-WT1 суспендировали в растворе BICANATE Injection для приготовления раствора для введения, содержащего 1×10^5 клеток/мл, для группы с низкой дозой, раствора для введения, содержащего 1×10^6 клеток/мл, для группы со средней дозой и раствора для введения, содержащего 1×10^7 клеток/мл, для группы с высокой дозой соответственно. Объем введения доз мышам был установлен на уровне 10 мл/кг. Количество вводимого раствора рассчитывали для каждой мыши, исходя из массы тела, определенной в день введения, и носитель или каждый раствор для дозирования клеток вводили однократно в хвостовую вену каждой мыши. После введения наблюдали за общим состоянием мышей и измеряли массу тела в течение 7 дней после введения. Затем мышей подвергали эвтаназии на день 7 после введения и проводили вскрытие. Каких-либо токсических эффектов (падеж, агония, снижение двигательной активности и т.д.) в результате введения носителя или каждого введенного раствора клеток не наблюдали в течение всешл периода наблюдения за общим состоянием (в целом наблюдали 3 раза до введения, через 1 ч после введения и через 4 ч после введения в день введения и один раз в день со дня после введения до вскрытия). Измерение массы тела проводили накануне введения, в день введения, на следующий день после введения, через 3 дня и 7 дней после введения. Снижение массы тела было отмечено через 3 дня после введения у самок и самцов в группе с высокой дозой (фиг. 3). При оценке потребления корма (потребление корма в день оценивали в период от 3 дней до введения до 1 дня перед введением, от дня введения до 1 дня после введения, от 1 дня после введения до 3 дней после введения и от 3 дней после введения до 7 дней после введения), снижение потребления корма было обнаружено со дня введения до дня после введения и со дня после введения до 3 дней после введения у самок в группе со средней дозой и у самок и самцов в группе с высокой дозой (фиг. 4). По результатам данного исследования в группе с низкой дозой не было обнаружено негативного влияния на массу тела и потребление корма, следовательно, доза 1×10^6 клеток/кг является верхним пределом дозы, не оказывающей негативного влияния на массу тела и потребление корма (эквивалентно дозе α-GalCer, равной 275 нг/кг, рассчитанной исходя из количества загруженного α-GalCer).

^{*}представляет «ниже, чем значение нижнего предела количественного определения», когда количество анализированных клеток составляет 10^6 клеток

Промышленная применимость

[0089] Ожидается, что настоящее изобретение будет пригодным для эффективного и безопасного лечения или профилактики рака с использованием aAVC.

Свободный текст списка последовательностей

[0090] «Искусственная последовательность» будет описана в цифровом заголовке <223> списка последовательностей, приведенного ниже.

Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 1 в списке собой последовательностей, представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий белок WT1, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 2 в списке последовательностей, представляет собой аминокислотную последовательность, кодированную последовательностью SEQ ID NO: 1. Нуклеотидная последовательность, показанная В SEQ IDNO: 3 последовательностей, собой представляет нуклеотидную последовательность, кодирующую белок CD1d человека, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 4 в списке последовательностей, представляет собой аминокислотную последовательность, кодированную последовательностью SEQ ID NO: 3. Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 5 в списке последовательностей, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую мышиный белок CD1d, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 6 в списке последовательностей, представляет собой аминокислотную последовательность, кодированную последовательностью SEQ ID NO: 5.

Список последовательностей

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или профилактики рака, включающий стадию введения клетки человеческого происхождения человеку,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d, содержит α -галактозилцерамид (α -GalCer), загруженный на клеточную поверхность,

и где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 2. Способ по п.1, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
 - 3. Способ по пп.1 или 2, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 4. Способ по любому из пп.1-3, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 5. Способ по любому из пп.1-4, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 6. Фармацевтическая композиция для лечения или профилактики рака, содержащая клетку человеческого происхождения,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

и где композицию вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 7. Фармацевтическая композиция по п.6, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
- 8. Фармацевтическая композиция по пп.6 или 7, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.6-8, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.6-9, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 11. Применение клетки человеческого происхождения для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики рака,

где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

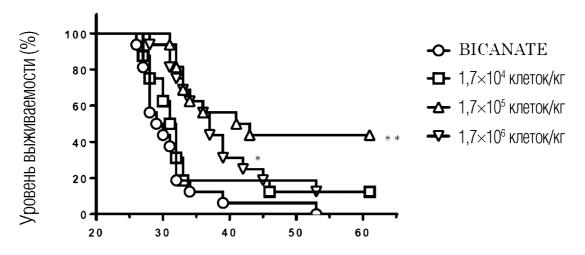
и где композицию вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.

- 12. Применение по п.11, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
 - 13. Применение по п. 11 или 12, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 14. Применение по любому из пп.11-13, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 15. Применение по любому из пп.11-14, где количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг на 1×10^6 клеток.
- 16. Клетка человеческого происхождения для применения в лечении или профилактике рака,

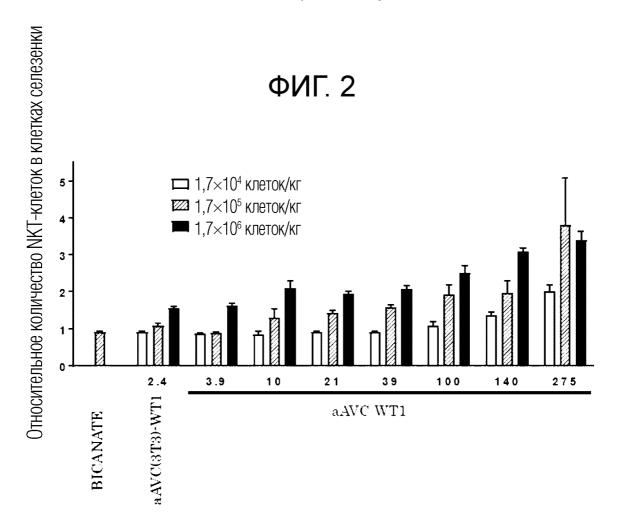
где клетка экспрессирует экзогенный CD1d и содержит α -GalCer, загруженный на клеточную поверхность,

- и где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α -GalCer, загруженная на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека.
- 17. Клетка человеческого происхождения по п.16, где клетка человеческого происхождения экспрессирует экзогенный опухолевый антиген.
- 18. Клетка человеческого происхождения по пп.16 или 17, где CD1d представляет собой CD1d человека.
- 19. Клетка человеческого происхождения по любому из пп.16-18, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК293).
- 20. Клетка человеческого происхождения по любому из пп.16-19, где количество α -GalCer, загруженное на поверхность клетки, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.
- 21. Способ получения клетки человеческого происхождения, которая экспрессируют экзогенный CD1d и содержит α-GalCer, загруженный на клеточную поверхность, где клетку вводят человеку таким образом, что разовая доза α-GalCer, загруженная на клеточную поверхность, составляет от 1,7 нг до 275 нг на кг массы тела человека, и где способ включает стадию культивирования клеток человеческого происхождения, экспрессирующих экзогенный CD1d, в культуральной среде, содержащей от 56 нг/мл до 3000 нг/мл α-GalCer.
- 22. Способ по п. 21, дополнительно включающий стадию измерения количества α -GalCer, загруженного на клетки, полученные на стадии культивирования, и отбор клетки, в которой количество α -GalCer, загруженное на клеточную поверхность, находится в диапазоне от 3,9 до 275 нг в расчете на 1×10^6 клеток.

ФИГ. 1



Количество дней после прививки опухоли

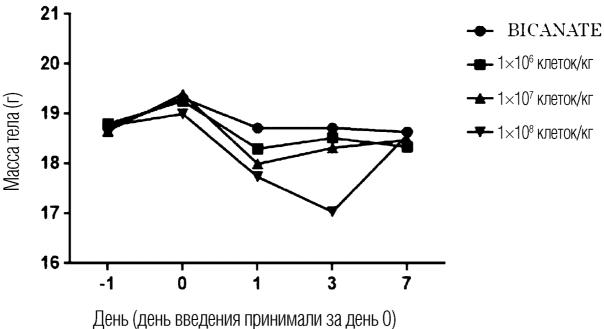


ФИГ. 3

1. Результаты определения массы тела у мышей-самцов в исследовании токсичности с введением однократной дозы на мышах

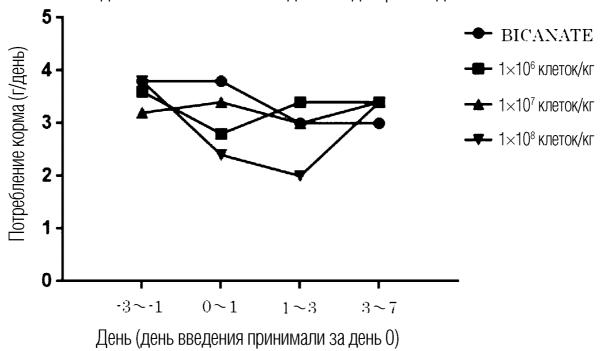


2. Результаты определения массы тела у мышей-самок в исследовании токсичности с введением однократной дозы на мышах



ФИГ. 4

1. Результаты определения потребления корма у мышей-самцов в исследовании токсичности с введением однократной дозы на мышах



2. Результаты определения потребления корма у мышей-самок в исследовании токсичности с введением однократной дозы на мышах

