

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291546 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.26

(22) Дата подачи заявки
2020.12.01

(51) Int. Cl. *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/22 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) NY-ESO-1-СОДЕРЖАЩАЯ ИСКУССТВЕННАЯ АДЬЮВАНТНАЯ ВЕКТОРНАЯ
КЛЕТКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

(31) 2019-217704

(32) 2019.12.02

(33) JP

(86) PCT/JP2020/044586

(87) WO 2021/112055 2021.06.10

(71) Заявитель:

АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК.; РИКЕН
(JP)

(72) Изобретатель:

Акиба Аяка, Окудаира Тацуя,
Масухара Ясухиде, Охсуми Кейсукэ,
Фудзии Синитиро (JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Целью изобретения является обеспечение клинически применимых клеток aAVC-NY-ESO-1, стабильно экспрессирующих NY-ESO-1, с целью использования клеток aAVC-NY-ESO-1 в лечении пациентов с NY-ESO-1-экспрессирующей опухолью. Изобретение относится, например, к клетке человеческого происхождения, содержащей полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

A1

202291546

202291546

A1

NY-ESO-1-СОДЕРЖАЩАЯ ИСКУССТВЕННАЯ АДЬЮВАНТНАЯ ВЕКТОРНАЯ КЛЕТКА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ЛЕЧЕНИИ РАКА

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к NY-ESO-1-содержащей искусственной адьювантной векторной клетке (клетке aAVC-NY-ESO-1) для применения в лечении рака.

Уровень техники

[0002] Было обнаружено, что белок плоскоклеточной карциномы пищевода Нью-Йорк 1 (NY-ESO-1), один из антигенов рака/яичка, экспрессируется в широком ряду опухолей, таких как рак предстательной железы и рак мочевого пузыря. С другой стороны, его экспрессия не наблюдается в нормальных клетках взрослых людей, за исключением яичка. Следовательно, данный антиген рассматривается в качестве подходящей молекулы-мишени для терапии рака, и лекарственные средства, включая вакцины, находятся на стадии разработки (непатентные документы 1-3).

[0003] Вакцина G305, представляющая собой смесь белка NY-ESO-1 и адьюванта глюкопиранозиллипида (GLA), проходит клинические испытания у пациентов с раком, экспрессирующим NY-ESO-1, и была подтверждена индукция NY-ESO-1-специфических Т-клеток после вакцинации (непатентный документ 4).

[0004] Fujii et al. получили искусственную адьювантную векторную клетку (aAVC) модификацией клеток человеческого происхождения, посредством индукции экзогенно экспрессировать CD1d и опухолевый антиген, и дополнительно стимулируя клетки α -галактозилцерамидом (α -GalCer) (патентные документы 1-3). Такие aAVC активируют естественные Т-клетки-киллеры (NKT) через их комплекс CD1d/ α -GalCer, и активированные NKT-клетки продуцируют цитокины, такие как IFN- γ , который, в свою очередь, активирует естественные клетки-киллеры (NK) и т.п. На мышинных моделях было показано, что введение aAVC оказывает противоопухолевый эффект, зависящий от NK-клеток (патентные документы 1-3). aAVC, введенные мышам, немедленно подвергаются киллингу активированными NKT-клетками *in vivo*, и фрагменты aAVC поглощаются дендритными клетками. Дендритные клетки с поглощенными таким образом фрагментами aAVC презентуют фрагменты опухолевого антигена, включенные в главный комплекс гистосовместимости (МНС) на клеточной поверхности, и индуцируют опухолевый антиген-специфические Т-клетки. На мышинных моделях также было показано, что введение aAVC оказывает противоопухолевый эффект за счет индукции опухолевого антиген-специфических Т-клеток (патентные документы 1-3 и непатентные документы 5 и 6). Таким образом, было показано, что aAVC 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.

Список цитированных ссылок

Патентные документы

[0005] 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: Thomas R. et al., «Frontiers in Immunology», (Switzerland), 2018; 9: 947

Непатентный документ 2: Gasser O. et al., «Cancer Immunology, Immunotherapy», (Germany), 2018; 67 (2): 285-298

Непатентный документ 3: Robbins P.F. et al., «Clinical Cancer Research», (USA), 2015; 21 (5): 1019-1027

Непатентный документ 4: Mahipal A. et al., «Cancer Immunology, Immunotherapy», (Germany), 2019; 68 (7): 1211-1222

Непатентный документ 5: Shimizu K. et al., «Cancer Research», (USA), 2013; 73 (1): 62-73

Непатентный документ 6: Shimizu K. et al., «Cancer Research», (USA), 2016; 76 (13): 3756-3766

Сущность изобретения

Техническая проблема для решения изобретением

[0007] Целью настоящего изобретения является создание aAVC, стабильно экспрессирующей NY-ESO-1 или его фрагмент.

Решение технической проблемы

[0008] Авторы настоящего изобретения провели обширные обстоятельные исследования по получению aAVC, экспрессирующей NY-ESO-1 в качестве опухолевого антигена, и в результате успешно получили aAVC, стабильно экспрессирующую NY-ESO-1. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили проблему конститутивной экспрессии NY-ESO-1, заключающуюся в снижении уровня экспрессии и уровня NY-ESO-1-положительных клеток с увеличением количества дней культивирования, и решили эту проблему проведением обстоятельных исследований. В частности, авторы настоящего изобретения обнаружили, что клетки, индуцибельно экспрессирующие NY-ESO-1 с индуцибельным промотором (в частности, промотором, индуцируемым лекарственным препаратом), демонстрируют более высокий уровень экспрессии NY-ESO-1, чем в случае клеток с конститутивной экспрессией NY-ESO-1, и успешно получили aAVC со стабильной и высокой экспрессией NY-ESO-1 под контролем индуцибельного промотора (пример 2-2). В частности, настоящее изобретение относится к aAVC, которую можно использовать для лечения рака, способу получения aAVC, фармацевтической композиции, содержащей aAVC, способу лечения рака с помощью aAVC и т. д.

[0009] В частности, настоящее изобретение может включать следующие аспекты в качестве соединения или способа, применимых с медицинской или промышленной точки зрения.

[0010] 1. Клетка человеческого происхождения, содержащая полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1, или его фрагмент операбельно связан с индуцибельным промотором.

2. Клетка по п.1, где NY-ESO-1 представляет собой NY-ESO-1 человека.

3. Клетка по пп.1 или 2, где CD1d представляет собой CD1d человека.

4. Клетка по любому из пп.1-3, где индуцибельный промотор представляет собой промотор, индуцируемый лекарственным препаратом.

5. Клетка по п.4, где промотор, индуцируемый лекарственным препаратом, представляет собой промотор, индуцируемый тетрациклином.

6. Клетка по п.5, где промотор, индуцируемый тетрациклином, представляет собой промотор TRE3G.

7. Клетка по любому из пп.1-6, где клетка человеческого происхождения представляет собой нормальную клетку.

8. Клетка по п.7, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293).

9. Клетка по любому из пп.1-8, экспрессирующая CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент.

10. Клетка по п.9, где уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента составляет от 245 нг до 45000 нг в расчете на 10^6 клеток.

11. Клетка по пп.9 или 10, где лиганд CD1d загружается на клеточную поверхность.

12. Клетка по п.11, где лиганд CD1d представляет собой α -GalCer.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по пп.11 или 12.

14. Фармацевтическая композиция по п.13 для применения в лечении рака.

15. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту клетки по пп.11 или 12.

16. Клетка по пп.11 или 12 для лечения рака.

17. Применение клетки по пп.11 или 12 для получения фармацевтической композиции для применения в лечении рака.

18. Способ получения клетки для применения в лечении рака, включающий стадию культивирования клетки по любому из пп.1-8 в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента.

19. Способ по п.18, дополнительно включающий стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность.

20. Способ получения клетки для применения в лечении рака, включающий стадию:

введения полинуклеотида, кодирующего CD1d, и полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент операбельно связан с индуцибельным промотором; или

введения полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий стадию культивирования клетки, полученной на стадии в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента.

22. Способ по п.21, дополнительно включающий стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность.

23. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту клетки по пп.11 или 12 и ингибитора иммунных контрольных точек.

24. Способ по п.23, где ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1 или ингибитор иммунной контрольной точки CTLA-4.

25. Способ получения фармацевтической композиции для применения в лечении рака, включающий стадии:

размораживания замороженного продукта, содержащего клонированную клетку человеческого происхождения, содержащую полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент операбельно связан с индуцибельным промотором;

размножения клеток человека, содержащихся в замороженном продукте, для индукции экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента; и

загрузки α -GalCer на клеточную поверхность.

[0011] Клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут использоваться в лечении рака.

Краткое описание фигур

[0012] На фиг. 1-1 показан эффект индукции антигенспецифических Т-клеток под действием клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1 по количеству NY-ESO-1-специфических Т-клеток у мышей, которым вводили клетки aAVC(3T3)-NY-ESO-1. На оси ординат указано количество пятен в 4×10^5 клетках селезенки, подсчитанное с помощью аппарата ELISPOT Reader. На оси абсцисс «носитель» обозначает контрольную группу мышей, которым вводили раствор BINACATE (бикарбонатный раствор Рингера), и aAVC-NY обозначает группу мышей, которым вводили aAVC(3T3)-NY-ESO-1. PAP и NY представляют собой пептид PAP и пептид NY-ESO-1, соответственно, использованные для стимуляции. «-» обозначает отсутствие добавления пептида. Показано число пятен на особь и среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего числа пятен.

На фиг. 1-2 показан противоопухолевый эффект клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1 у мышей с меланомой B16, экспрессирующей NY-ESO-1, и мышей с меланомой B16-F10. На оси ординат указан объем опухолей, на оси абсцисс указано количество дней после

прививки опухолевых клеток. Вертикальные линии изображают среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего, и число мышей на время измерения указано в скобках. Р-значение уровня значимости (**: $P < 0,01$) рассчитывали сравнением объема опухолей на день 20 в группе, получавшей носитель, и в группе, получавшей клетки aAVC(3T3)-NY-ESO-1, с использованием t-критерия Стьюдента.

На фиг. 1-3 показан противоопухолевый эффект клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1 у мышей с меланомой B16, экспрессирующей NY-ESO-1. На оси ординат указан объем опухолей, и на оси абсцисс указано количество дней после инокуляции клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Вертикальные линии изображают среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего. Р-значение уровня значимости (**: $P < 0,01$) рассчитывали сравнением объема опухолей на день 10 в группе, получавшей носитель, и в группе, получавшей клетки aAVC(3T3)-NY-ESO-1, с использованием критерия множественных сравнений Даннетта.

На фиг. 2-1 по 2-4 показаны зависящие от времени изменения различных показателей клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d (CMV на фигурах) и клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d (Tet-on на фигурах). На фиг. 2-1 показаны уровни экспрессии NY-ESO-1 в расчете на 1×10^6 клеток CMV и Tet-on. На оси ординат указан уровень экспрессии NY-ESO-1, и на оси абсцисс указано количество дней культивирования после инфицирования.

На фиг. 2-2 приведены уровни NY-ESO-1-положительных клеток CMV и Tet-on. На оси ординат указан уровень NY-ESO-1-положительных клеток, и на оси абсцисс указано количество дней культивирования после инфицирования.

На фиг. 2-3 приведены показатели выживаемости CMV и Tet-on. На оси ординат указан уровень выживаемости клеток в каждом пуле, и на оси абсцисс указано количество дней культивирования после инфицирования.

На фиг. 2-4 показано время удвоения CMV и Tet-on. На оси ординат указано время удвоения, и на оси абсцисс указано количество дней культивирования после инфицирования.

На фиг. 3 показаны уровни экспрессии NY-ESO-1 в различных клонах, выделенных из клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d (CMV на фигуре) и клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d (Tet-on на фигуре). Число представляет количество клонов, и числовые значения отображают уровни экспрессии NY-ESO-1 в расчете на 1×10^6 клеток.

На фиг. 4-1 показаны противоопухолевые эффекты клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, анти-PD-1 антитела и их комбинированного применения у мышей с меланомой B16, экспрессирующей NY-ESO-1. На оси ординат указан объем опухолей, и на оси абсцисс указано количество дней после введения клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Вертикальные линии изображают среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего, и количество мышей на время измерения указано в скобках.

На фиг. 4-2 показаны противоопухолевые эффекты клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1,

анти-PD-1 антитела и их комбинированного применения у мышей с карциномой CT26, экспрессирующей NY-ESO-1. На оси ординат указан объем опухолей, и на оси абсцисс указано количество дней после введения клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1. Вертикальные линии изображают среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего.

На фиг. 5 показаны противоопухолевые эффекты клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, анти-CTLA-4 антитела и их комбинированного применения у мышей с карциномой CT26, экспрессирующей NY-ESO-1. На оси ординат указан объем опухолей, на оси абсцисс указано количество дней после прививки опухолевых клеток. Вертикальные линии изображают среднее значение $\pm$ стандартную ошибку среднего. $n=9$ мышей в группе с комбинированным применением клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-CTLA-4 антитела на день 18 или позднее.

Подробное описание предпочтительных вариантов осуществления

[0013] 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.

[0014] «Искусственная адъювантная векторная клетка»

В рамках настоящего изобретения, термины «искусственная адъювантная векторная клетка» и «aAVC» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Термины означают клетку, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид CD1d (далее также относится к «CD1d»), и полинуклеотид(ы), кодирующий один или два или более произвольных опухолевых антигенов или их фрагментов.

В рамках настоящего изобретения, выражение «содержащая полинуклеотид» относится к состоянию, когда клетка эндогенно содержит полипептид, или полинуклеотид был введен в клетку экзогенным способом. В данном контексте термины «эндогенный» или «эндогенно» могут использоваться в значении, обычно используемом специалистами в данной области таким образом, что выделенная клетка содержит конкретный ген или полинуклеотид или экспрессирует белок. В рамках настоящего изобретения, термины «экзогенный» или «экзогенно» используются взаимозаменяемо и относятся к введению искусственно созданного гена или полинуклеотида в представляющую интерес клетку с использованием такой процедуры, как генетическая манипуляция или введение гена, и искусственная экспрессия белка, кодированного геном или полинуклеотидом, искусственно введенным в представляющую интерес клетку.

[0015] «Клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению»

Настоящее изобретение относится к клетке человеческого происхождения, содержащей:

полинуклеотид, кодирующий CD1d, и

полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным

промотором (в настоящем описании также относится к «клетке aAVC-NY-ESO-1»).

[0016] «1. Клетка человеческого происхождения»

Клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой нормальную клетку или клетку, полученную из опухолевой ткани, и которая может эндогенно экспрессировать CD1d.

Клетка, полученная от человека, такая как клетка, выделенная и/или очищенная из произвольной ткани человека, клетка, полученная из определенного вида клеток, стабильная клеточная линия, полученная из ткани человека, или клетка, дифференцированная из стволовой клетки, может использоваться как нормальная клетка. Нормальная клетка может иметь способность к пролиферации. В качестве клетки, полученной из опухолевой ткани, может использоваться клетка, выделенная и/или очищенная из опухолевой ткани пациента, или стабильная клеточная линия, полученная из опухолевой ткани человека. В данном контексте термин «выделение» означает выделение из живой ткани. Термин «очистка» означает отделение клетки, полученной от человека, от одного или более других компонентов, содержащихся в ткани, из которой получена клетка. Выделение и очистку клеток можно проводить способами, известными в данной области. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, представляет собой нормальную клетку.

[0017] Клетка, выделенная и/или очищенная из произвольной ткани человека, 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, периферической крови и т.п. Клетка, выделенная и/или очищенная из произвольной ткани человека, может обладать способностью к пролиферации. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем изобретении, не представляет собой гемоцит.

[0018] Клетка, полученная из определенного вида клеток, представляет собой клетку, полученную из определенного вида клеток ткани человека (например, эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, эпидермальные клетки, стромальные клетки, фибробласты, адипоциты, клетки молочной железы, мезангиальные клетки, α -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 (например, дендритные клетки, макрофаги и В-клетки)).

[0019] Такую стабильную клеточную линию, происходящую из ткани человека, можно получить с использованием метода, известного специалистам в данной области, или она является коммерчески доступной. Примеры клеточных линий включают клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293) (J. Gen. Virol.; 1977; 36: 59-74), клетки WI-38, клетки SC-01MFP и клетки MRC-5, и клетки, полученные из этих клеток. В одном варианте осуществления клетка человеческого происхождения, используемая в настоящем

изобретении, представляет собой клетку, полученную из клетки HEK293. В одном варианте осуществления клетка, полученная из клетки HEK293, представляет собой клетку FreeStyle™ 293-F.

[0020] Клетка, подвергшаяся дифференцировке из стволовой клетки, представляет собой клетку, дифференцированную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки (iPS-клетка) или эмбриональной стволовой клетки (ES-клетка) человека. iPS-клетки или ES-клетки и клетки, полученные из этих клеток, могут быть получены с использованием способов, известных специалистам в данной области.

[0021] Клетку, происходящую из опухолевой ткани, можно получить выделением и/или очисткой из опухолевой ткани пациента способом, известным специалистам в данной области. В качестве альтернативы можно использовать стабильную клеточную линию, полученную из опухолевой ткани человека, обычно доступную специалистам в данной области из такой организации, как Американская коллекция типовых культур (ATCC®).

[0022] «2. NY-ESO-1»

Клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, кодирующий белок плоскоклеточной карциномы пищевода Нью-Йорк 1 (NY-ESO-1) или его фрагмент в качестве опухолевого антигена. Было обнаружено, что NY-ESO-1, белок, также известный как антиген рака/яичка 1 (CTAG1), экспрессируется при различных видах рака, но известно, что он экспрессируется только в ткани яичка среди нормальных тканей взрослого человека.

[0023] В рамках настоящего изобретения, NY-ESO-1 может представлять собой встречающийся в природе NY-ESO-1 или может представлять собой его модифицированную форму при условии, что модифицированная форма индуцирует NY-ESO-1-специфические Т-клетки при введении в виде aAVC. В одном варианте осуществления NY-ESO-1, используемый в настоящем изобретении, представляет собой NY-ESO-1, происходящий от млекопитающих (например, людей, обезьян, мышей, крыс, собак и шимпанзе). В одном варианте осуществления NY-ESO-1 представляет собой человеческий NY-ESO-1. В одном варианте осуществления NY-ESO-1 человека представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления NY-ESO-1 человека представляет собой полипептид, 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 полипептидом, состоящим из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления человеческий NY-ESO-1 представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2, посредством делеции, замены, инсерции и/или добавления 1 или более, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 1 до 7, еще более предпочтительно от 1 до 5, от 1 до 3, или от 1 до 2 аминокислот. NY-ESO-1,

используемый в настоящем изобретении, может представлять собой фрагмент NY-ESO-1, при условии, что этот фрагмент индуцирует NY-ESO-1-специфические Т-клетки при введении в виде аAVC. В одном варианте осуществления фрагмент NY-ESO-1 представляет собой фрагмент человеческого NY-ESO-1. В одном варианте осуществления фрагмент человеческого NY-ESO-1 представляет собой полипептид, имеющий 20% или более, 30% или более, 40% или более, 50% или более, 55% или более, 60% или более, 65% или более, 70% или более, 75% или более, 80% или более, 85% или более, 90% или более, или 95% или более от длины аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 2. Индукцию NY-ESO-1-специфических Т-клеток при введении в виде аAVC можно оценить методом, описанным, например, в примере 1-2, приведенном ниже. Полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, используемый в настоящем изобретении, может быть получен конструированием нуклеотидной последовательности из аминокислотной последовательности используемого NY-ESO-1 или его фрагмента, с использованием метода, известного в данной области. В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1, представляет собой полинуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1.

[0024] 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.

[0025] «3. CD1d»

Клетка аAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, кодирующий CD1d. CD1d представляет собой гликопротеин, подобный молекуле MHC класса I, экспрессируемый на клеточной поверхности. CD1d, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой встречающийся в природе CD1d или его модифицированную форму при условии, что она выполняет функцию CD1d при экспрессии клеткой человеческого происхождения. 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 аAVC активировать NKT-клетки человека. Эту способность активировать NKT-клетки человека можно оценить в системе оценки *in vitro*, представленной, например, на фиг. 1 непатентного документа 5. Вкратце, активацию NKT-клеток можно оценить сокультивированием CD1d-экспрессирующих клеток, культивируемых в присутствии α -GalCer, с NKT-клетками, и измерением количества IFN- γ в культуральном растворе.

[0026] 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 представляет собой CD1d человека. В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления человеческий CD1d представляет собой полипептид, который состоит из аминокислотной последовательности, полученной из аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4 с делецией, заменой, инсерцией и/или добавлением 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 CD1d человека представляет собой полипептид, 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 полипептидом, показанным в SEQ ID NO: 4, и обладает функцией CD1d.

[0027] Полинуклеотид, кодирующий CD1d, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой эндогенный полинуклеотид в используемой клетке человеческого происхождения или экзогенно введенный полинуклеотид. В случае экзогенно введенного полинуклеотида, кодирующего CD1d, в клетку человеческого происхождения, полинуклеотид можно получить конструированием нуклеотидной последовательности из используемой аминокислотной последовательности CD1d, с использованием способа, известного в данной области. В одном варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий CD1d, представляет собой полинуклеотид, состоящий из нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 3.

[0028] «4. Промотор»

В клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцируемым промотором. В рамках настоящего изобретения, выражение «операбельно связанный» означает состояние, когда промотор связан с полинуклеотидом для контролирования промотором экспрессии полипептида в клетках-хозяевах. В клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению в случае экзогенно введенного полинуклеотида, кодирующего CD1d, в клетку человеческого происхождения, полинуклеотид может быть операбельно связан с промотором. В этом случае любой из промоторов, конститутивно стимулирующих экспрессию, и индуцибельных промоторов можно использовать в качестве промотора для экспрессии CD1d.

[0029] Термин «индуцибельный промотор» представляет собой промотор, индуцибельно стимулирующий экспрессию, и относится к промотору, который может индуцировать экспрессию полинуклеотида, операбельно связанного с промотором, в присутствии индуктора, направляющего промотор (в настоящем описании также относится у «индуктору индуцибельного промотора» или просто «индуктору»). Примеры индуцибельного промотора включают промоторы, индуцируемые нагреванием (например,

промотор теплового шока) и промоторы, индуцируемые лекарственным препаратом. В одном варианте осуществления индуцибельный промотор представляет собой промотор, индуцируемый лекарственным препаратом. В рамках настоящего изобретения, термин «промотор, индуцируемый лекарственным препаратом» означает промотор, который регулирует экспрессию полинуклеотида, операбельно связанного с промотором через лекарственный препарат-индуктор. Примеры промотора, индуцируемого лекарственным препаратом, включают последовательность куматного оператора, последовательность λ -оператора ($12 \times \lambda Op$) и индуцибельный промотор системы индукции экспрессии гена тетрациклином (далее относится к «промотору, индуцируемому тетрациклином»). Последовательность куматного оператора неактивна в присутствии репрессора CymR, но диссоциирует от репрессора CymR в присутствии куматного индуктора с последующей индукцией экспрессии полинуклеотида, операбельно связанного с промотором. Последовательность λ -оператора индуцирует экспрессию полинуклеотида, операбельно связанного с промотором, в присутствии индуктора, такого как кумермицин, который димеризует активатор (λRep -GyrB-AD), обладающий способностью активировать транскрипцию посредством димеризации. Промотор, индуцируемый тетрациклином, индуцирует экспрессию полинуклеотида, операбельно связанного с промотором, в присутствии индуктора тетрациклина или его производного (например, доксициклина) и обратного трансактиватора, контролируемого тетрациклином (rtTA) (например, Tet-On 3G). Примеры промотора, индуцируемого тетрациклином, включают промотор TRE3G. В одном варианте осуществления промотор, индуцируемый лекарственным препаратом, представляет собой промотор, индуцируемый тетрациклином. В одном варианте осуществления промотор, индуцируемый тетрациклином, представляет собой промотор TRE3G.

[0030] Примеры промоторов, конститутивно стимулирующих 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).

[0031] В клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента можно индуцировать культивированием клетки в присутствии индуктора индуцибельного промотора. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению экспрессирует NY-ESO-1 или его фрагмент. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент. В одном варианте нижний предел уровня экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению может составлять более 88 нг, 90 нг или более, 100 нг или более, 150 нг или более, 200 нг или более, 245 нг или более, 250 нг или более, 300 нг или более, 400 нг или более, 500 нг или более, 600 нг или более, 700 нг или более, 800 нг или более, 900 нг или более, 1000 нг или более, 1500 нг или более, 2000 нг или более, 2500 нг или более, 3000 нг или более, 4000 нг или более, 5000 нг или более, 6000 нг или более, 7000 нг

[illegible]

[0032] «5. Лиганд CD1d»

В одном варианте осуществления в клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему

изобретению лиганд CD1d может быть загружен на клеточную поверхность. В рамках настоящего изобретения, выражение «лиганд CD1d был загружен на клеточную поверхность» относится к состоянию, когда лиганд CD1d связывается с поверхностью клетки aAVC. Загрузка лиганда CD1d на клеточную поверхность может быть осуществлена стимулирующей обработкой клеток, экспрессирующих CD1d, лигандом CD1d (например, α -GalCer), как описано в разделе «Способ получения клеток AVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению». В рамках настоящего изобретения, выражение «стимулирующая обработка лигандом CD1d» относится к приведению в контакт клеток с лигандом CD1d в культуральной среде. В aAVC, стимулированной лигандом CD1d, лиганд CD1d загружается на все или, по меньшей мере, на часть молекул CD1d.

[0033] Примеры лиганда CD1d, используемого в настоящем изобретении, включают α -галактозилцерамид (α -GalCer), α -С-галактозилцерамид (α -C-GalCer), 7DW8-5 и изоглоботригексозилцерамид (iGb3). В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer. α -GalCer, имеющий химическое название (2S,3S,4R)-1-O-(α -D-галактозил)-N-гексакозаноил-2-амино-1,3,4-октадекантриол, 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)).

[0034] «Способ получения клеток AVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению»

Клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению можно получить введением полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, и, при необходимости, полинуклеотида, кодирующего CD1d, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. Способ получения клеток aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению может дополнительно включать стадии: культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1; клонирования клетки; и загрузки лиганда CD1d на клеточную поверхность.

[0035] «1. Введение полинуклеотида в клетку человеческого происхождения»

Клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению можно получить введением полинуклеотида, кодирующего CD1d, и полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором (далее вводимые полинуклеотиды также относятся к «представляющим интерес полинуклеотидам»). Альтернативно, в случае использования клетки, эндогенно экспрессирующей CD1d, в качестве клетки человеческого происхождения, клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению можно получить введением полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

[0036] Полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, можно сконструировать и получить с использованием стандартного молекулярно-биологического и/или химического метода, например, посредством получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих аминокислотные последовательности, по идентификационным номерам из баз данных NCBI RefSeq или GenBank. Например, эти полинуклеотиды 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.

[0037] Введение представляющих интерес полинуклеотидов в клетку человеческого происхождения может быть осуществлено с использованием любого метода с невирусной векторной системой или вирусной векторной системой, такого как электропорация, липофекция или микроинъекция. В случае использования метода с невирусной векторной системой представляющие интерес полинуклеотиды могут находиться в такой форме, как плазмидный вектор или кДНК, или в форме мРНК.

[0038] Плазмидный вектор или вирусный вектор можно использовать в качестве экспрессионного вектора для экзогенной экспрессии CD1d или NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке человеческого происхождения. Экспрессионный вектор особым образом не ограничивается, при условии, что экспрессионный вектор обеспечивает экспрессию представляющего интерес полипептида. Экспрессионный вектор может быть получен с использованием способа, известного специалистам в данной области. Например, для экспрессионного вектора в виде плазмидного вектора можно использовать серию pcDNA (Thermo Fisher Scientific Inc.), pALTER(R)-MAX (Promega Corp.) или pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.), и например, в качестве вирусного вектора можно использовать вектор на основе лентивируса, аденовируса, ретровируса или аденоассоциированного вируса. Например, в случае использования лентивируса для введения представляющих интерес полинуклеотидов в клетку человеческого происхождения, лентивирус может быть получен с использованием вектора pLV SIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.) или вектора pLenti (Thermo Fisher Scientific Inc.). Когда клетка человеческого происхождения подвергается индукции для экзогенной экспрессии CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмента, то полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, могут быть введены в клетку человеческого происхождения с использованием одного экспрессионного вектора или могут быть введены в нее с использованием отдельных экспрессионных векторов. Экспрессионный вектор может также содержать ген, способный служить в качестве маркера для подтверждения экспрессии представляющего интерес гена или полинуклеотида (например, ген устойчивости к лекарственным препаратам, ген, кодирующий репортерный фермент, или ген, кодирующий флуоресцентный белок). 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.

[0039] В одном варианте осуществления способ получения клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению включает стадию введения экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CD1d, и экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления способ получения клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению включает стадию введения экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления способ получения клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению включает стадию введения экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления этих способов экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор или вирусный вектор. В одном варианте осуществления экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[0040] В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой клетку, полученную введением экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CD1d, и экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой клетку, полученную введением экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой клетку, полученную введением экспрессионного вектора, содержащего полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления в отношении этих клеток экспрессионный вектор представляет собой плазмидный вектор или вирусный вектор. В одном варианте осуществления экспрессионный вектор представляет собой вирусный вектор. В одном варианте

осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В одном варианте осуществления полученная клетка aAVC-NY-ESO-1 содержит полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, внехромосомно или в геномной ДНК ядра клетки, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент операбельно связан с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления полученная клетка содержит полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, в геномной ДНК ядра клетки, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

[0041] «2. Культивирование клетки aAVC-NY-ESO-1»

Клетку aAVC-NY-ESO-1, полученную способом, описанным выше, можно дополнительно стимулировать для пролиферации посредством культивирования. Культивирование клеток для поддержания или пролиферации клетки aAVC-NY-ESO-1 осуществляют 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, ростовой фактор, цитокин, антиоксидант, 2-меркаптоэтанол, пировиноградную кислоту, буфер, неорганическую соль или антибиотик. В одном варианте осуществления среда для использования при культивировании представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным химическим составом.

[0042] Специалисты в данной области могут быть соответствующим образом выбрать условия культивирования (например, условия культивирования, такие как время культивирования, температура, pH среды и концентрация CO₂). Значение pH 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 CO₂ 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.

[0043] Во время культивирования клеток aAVC-NY-ESO-1 экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента можно индуцировать приведением в контакт клеток aAVC-NY-ESO-1 с индуцибельным промотором. В одном варианте осуществления способ получения клеток aAVC-NY-ESO-1 включает стадию культивирования клеток aAVC-NY-ESO-1 в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию

NY-ESO-1 или его фрагмента. В одном варианте осуществления индуцибельный промотор представляет собой промотор, индуцируемый лекарственным препаратом, и способ получения включает стадию культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1 в присутствии индуктора промотора, индуцируемого лекарственным препаратом. В случае использования промотора, индуцируемого лекарственным препаратом, экспрессию гена или полинуклеотида, операбельно связанного с промотором, индуцируемым лекарственным препаратом, можно индуцировать культивированием клетки в среде с добавлением индуктора лекарственного препарата, такого как тетрациклин, доксициклин, кумат или кумермицин. Данную стадию можно выполнить в соответствии с методом индукции генов с использованием общей системы индукции генов. В одном варианте осуществления промотор, индуцируемый лекарственным препаратом, представляет собой промотор, индуцируемый тетрациклином, и способ получения включает стадию культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1 в присутствии тетрациклина или его производного и rtTA. В одном варианте осуществления промотор, индуцируемый тетрациклином, представляет собой промотор TRE3G, и способ получения включает стадию культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1 в присутствии тетрациклина или его производного и Tet-On 3G. Уровни экспрессии CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке AVC-NY-ESO-1 можно измерить с помощью метода, известного специалистам в данной области, такого как вестерн-блоттинг, ELISA или проточная цитометрия с использованием анти-CD1d антитела или анти-NY-ESO-1 антитела.

[0044] «3. Клонирование клетки aAVC-NY-ESO-1»

В случае введения полинуклеотида в клетки сосуществуют клетки, в которые был введен представляющий интерес полинуклеотид, и клетки, в которые не был введен представляющий интерес полинуклеотид. Кроме того, в случае интеграции представляющего интерес полинуклеотида в геномную ДНК клеточного ядра место интеграции также различается в зависимости от клетки. Таким образом, эти клетки могут представлять собой гетерогенную популяцию. В рамках настоящего изобретения, гетерогенная популяция клеток называется «клеточным пулом». Отдельные клетки, в которые были введены полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором (далее относится к «клонированным клеткам»), могут быть получены способом получения клеток, имеющих один генотип, из клеточного пула (в настоящем описании именуемым «клонированием») и стимулированы к пролиферации, с получением тем самым популяции клеток, имеющей один генотип (далее относится к «популяции клонированных клеток»). Клонирование клетки aAVC-NY-ESO-1 можно осуществить с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области. Например, можно использовать метод лимитирующих разведений, метод сортировки отдельных клеток или метод сбора колоний. В одном варианте осуществления в способе клонирования клетки aAVC-NY-ESO-1 может использоваться один метод или комбинация двух или более методов,

выбранных из метода лимитирующих разведений, метода сортировки отдельных клеток и метода сбора колоний. В одном варианте осуществления способ клонирования клетки aAVC-NY-ESO-1 представляет собой метод лимитирующих разведений.

[0045] Для каждого клона клеток aAVC-NY-ESO-1, полученных вышеуказанным способом, приведением в контакт части клеток клона с индуктором индуцибельного промотора и измерением уровня экспрессии CD1d и NY-ESO-1 или фрагмента в каждом клоне, можно отобрать популяцию клонированных клеток aAVC-NY-ESO-1, которые демонстрируют желаемые уровни экспрессии для CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмента в присутствии индуктора. Отобранную популяцию клонированных клеток можно хранить в замороженном состоянии (также относится здесь к «замороженному продукту») и использовать в качестве исследовательского банка клеток (RCB). Клетки RCB можно культивировать для пролиферации, затем заморозить и использовать в качестве главного банка клеток (MCB). Клетки MCB можно культивировать для пролиферации, затем заморозить и использовать в качестве рабочего банка клеток (WCB). Клетки WCB можно культивировать и использовать в качестве фармацевтического сырьевого материала. Каждый банк клеток может содержать криоконсервант. Каждый банк клеток может быть распределен по множеству контейнеров (например, от 2 до 10000 контейнеров, например, от 10 до 1000 контейнеров, например, от 100 до 500 контейнеров) и храниться в замороженном состоянии. Размораживание, культивирование и приведение в контакт с индуктором клонированных клеток aAVC-NY-ESO-1, и измерение уровней экспрессии CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмента можно выполнить с помощью способа, известного специалистам в данной области. Культивирование, приведение в контакт с индуктором и измерение уровней экспрессии можно проводить, используя, например, способ, описанный в разделе «2. Культивирование клетки AVC-NY-ESO-1». В одном варианте осуществления культивирование и приведение в контакт с индуктором клонированных клеток aAVC-NY-ESO-1 и измерение уровней экспрессии CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмента можно проводить после размораживания RCB и WCB.

[0046] В одном варианте нижний предел уровня экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет более 88 нг, 90 нг или более, 100 нг или более, 150 нг или более, 200 нг или более, 245 нг или более, 250 нг или более, 300 нг или более, 400 нг или более, 500 нг или более, 600 нг или более, 700 нг или более, 800 нг или более, 900 нг или более, 1000 нг или более, 1500 нг или более, 2000 нг или более, 2500 нг или более, 3000 нг или более, 4000 нг или более, 5000 нг или более, 6000 нг или более, 7000 нг или более, 8000 нг или более, 9000 нг или более или 10000 нг или более, и верхний предел уровня экспрессии составляет 30000 нг или менее, 35000 нг или менее, 40000 нг или менее, 43890 нг или менее, 45000 нг или менее, 50000 нг или менее, 55000 нг или менее или 60000 нг или менее в качестве верхнего предельного значения в расчете на 10^6 клеток. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 50000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в

полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в полученной клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 35000 нг.

[0047] «4. Загрузка лиганда CD1d на клетку AVC-NY-ESO-1»

Клетку aAVC-NY-ESO-1 с загруженным на нее лигандом CD1d можно получить стимулирующей обработкой клетки aAVC-NY-ESO-1 лигандом CD1d. Специалисты в данной области могут быть соответствующим образом скорректировать условия стимулирующей обработки с использованием лиганда CD1d (например, время добавления лиганда CD1d в клеточную культуральную среду, концентрация лиганда CD1d в культуральной среде и время культивирования) с учетом используемых клеток и условий культивирования. Концентрация лиганда CD1d, добавляемая в культуральную среду для клеток aAVC-NY-ESO-1, особым образом не ограничивается и может быть соответствующим образом выбрана в диапазоне, например, от 1 нг/мл до 10000 нг/мл. В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer. В одном варианте осуществления загрузку лиганда CD1d на клетку aAVC-NY-ESO-1 можно

осуществить до приведения в контакт клетки с индуктором. В одном варианте осуществления загрузку лиганда CD1d на клетку aAVC-NY-ESO-1 можно осуществить после приведения в контакт клетки с индуктором. В одном варианте осуществления загрузку лиганда CD1d на клетку aAVC-NY-ESO-1 можно провести одновременно с приведением в контакт клетки с индуктором. В этих вариантах осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 предпочтительно представляет собой клонированную клетку.

[0048] В полученной таким образом клетке aAVC-NY-ESO-1, экспрессирующей CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент, и с загруженным на нее лигандом CD1d, клеточную пролиферацию можно остановить искусственным способом. Способ остановки пролиферации клеток особым образом не ограничивается. Например, можно использовать способ остановки пролиферации клеток воздействием радиоактивных лучей (например, рентгеновских лучей), или способ добавления лекарственного препарата, такого как митомицин С. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению может представлять собой клетку, экспрессирующую CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент с остановленной пролиферацией. В одном варианте осуществления клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению может представлять собой клетку, экспрессирующую CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент с загруженным на нее лигандом CD1d, и пролиферация которой остановлена.

[0049] «Фармацевтическая композиция и т.д. по настоящему изобретению»

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению. В фармацевтической композиции клетка aAVC-NY-ESO-1 экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент и содержит лиганд CD1d, загруженный на клеточную поверхность. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция представляет собой фармацевтическую композицию для применения в лечении рака. В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer. Фармацевтическую композицию можно приготовить обычно используемым способом с использованием эксципиента, обычно используемого в данной области, т.е. эксципиента для лекарственного препарата, носителя для лекарственного препарата 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 капельные инфузии. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать замороженный продукт, клетки aAVC-NY-ESO-1. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать замороженный продукт, клетки aAVC-NY-ESO-1 и криоконсервант. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать суспензию клеток aAVC-NY-ESO-1. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать суспензию клеток aAVC-NY-ESO-1 и криоконсервант.

Настоящее изобретение также относится к применению клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению для производства фармацевтической композиции для применения в лечении рака, где клетка экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент и содержит лиганд CD1d, загруженный на клеточную поверхность. В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer. Настоящее изобретение также относится к клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению для лечения рака, где клетка экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент и содержит лиганд CD1d, загруженный на клеточную поверхность. В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer.

[0050] Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему стадию введения субъекту клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению. В способе клетка aAVC-NY-ESO-1 экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент и содержит лиганд CD1d, загруженный на клеточную поверхность. В одном варианте осуществления лиганд CD1d представляет собой α -GalCer. В рамках настоящего изобретения, термин «субъект» относится к млекопитающим (например, людям, обезьянам, мышам, крысам, собакам и шимпанзе). В одном варианте осуществления субъектом является человек. В настоящем описании термин «лечение» используется в значении, включающем терапевтическое лечение и профилактическое лечение. В случае введения субъекту клетки aAVC-NY-ESO-1, клетку aAVC-NY-ESO-1 можно вводить субъекту в виде фармацевтической композиции, содержащей эту клетку и фармацевтически приемлемый эксципиент. Дозу клетки aAVC-NY-ESO-1 для субъекта 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. Например, в качестве дозы клетки aAVC-NY-ESO-1 можно использовать от 1×10^3 клеток/кг до 1×10^9 клеток/кг на дозу для субъекта. В отношении способа введения клетки aAVC-NY-ESO-1 субъекту, то клетку aAVC-NY-ESO-1 можно вводить, например, внутривенной, интратуморальной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутривентриальной или внутриартериальной инъекцией или капельной инфузией. 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.

[0051] Примеры рака, на который направлено лечение или профилактика по настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь этим: злокачественные 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, колоректальный рак, рак толстого кишечника, 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. В одном варианте осуществления рак, на который направлено лечение по настоящему изобретению, представляет собой NY-ESO-1-положительный рак.

[0052] В фармацевтической композиции, применении, клетке и способе лечения рака по настоящему изобретению нижний предел уровня экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 может составлять, например, более 88 нг, 90 нг или более, 100 нг или более, 150 нг или более, 200 нг или более, 245 нг или более, 250 нг или более, 300 нг или более, 400 нг или более, 500 нг или более, 600 нг или более, 700 нг или более, 800 нг или более, 900 нг или более, 1000 нг или более, 1500 нг или более, 2000 нг или более, 2500 нг или более, 3000 нг или более, 4000 нг или более, 5000 нг или более, 6000 нг или более, 7000 нг или более, 8000 нг или более, 9000 нг или более или 10000 нг или более, и верхний предел уровня экспрессии может составлять 30000 нг или менее, 35000 нг или менее, 40000 нг или менее, 43890 нг или менее, 45000 нг или менее, 50000 нг или менее, 55000 нг или менее или 60000 нг или менее в качестве верхнего предельного значения в расчете на 10^6 клеток. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет более 88 нг, 90 нг или более, 100 нг или более, 150 нг или более, 200 нг или более, 245 нг или более, 250 нг или более, 300 нг или более, 400 нг или более, 500 нг или более, 600 нг или более, 700 нг или более, 800 нг или более, 900 нг или более, 1000 нг или более, 1500 нг или более, 2000 нг или более, 2500 нг или более, 3000 нг или более, 4000 нг или более, 5000 нг или более, 6000 нг или более, 7000 нг или более, 8000 нг или более, 9000 нг или более, или 10000 нг или более в качестве нижнего предельного значения, и 30000 нг или менее, 35000 нг или менее, 40000 нг или менее, 43890 нг или менее, 45000 нг или менее, 50000 нг или менее, 55000 нг или менее, или 60000 нг или менее в качестве верхнего предельного значения в расчете на 10^6 клеток. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 50000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или

его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 89 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 106 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 245 нг до 35000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 45000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 43890 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 40000 нг. В одном варианте осуществления уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента в клетке aAVC-NY-ESO-1 составляет от 1000 нг до 35000 нг.

[0053] «Способ получения клеток или фармацевтической композиции для применения в лечении рака»

Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки или фармацевтической композиции для применения в лечении рака, включающему стадию приведения в контакт клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению с индуцибельным промотором для индукции экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента. В одном варианте осуществления способ получения включает стадию культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1 в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента. В одном варианте осуществления способ получения дополнительно включает стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность. Загрузка лиганда CD1d на клеточную поверхность может осуществляться до, после или одновременно с приведением в контакт клетки aAVC-NY-ESO-1 с индуктором. Настоящее изобретение также относится к применению клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции для применения в лечении рака.

[0054] Настоящее изобретение также относится к способу получения клетки или фармацевтической композиции для применения в лечении рака, включающему стадию:

введения полинуклеотида, кодирующего CD1d, и полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором; или

введения полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

[0055] В одном варианте осуществления способ получения дополнительно включает стадию приведения в контакт клетки, полученной на стадии (клетки aAVC-NY-ESO-1), с индуктором индуцибельного промотора для индукции экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента. В одном варианте осуществления способ получения включает стадию культивирования клетки aAVC-NY-ESO-1 в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента. В одном варианте осуществления способ получения дополнительно включает стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность. Загрузка лиганда CD1d на клеточную поверхность может осуществляться до, после или одновременно с приведением в контакт клетки aAVC-NY-ESO-1 с индуктором.

[0056] Конкретные варианты осуществления, касающиеся клетки и стадий и т. д. для применения в способе получения, описанном в этом разделе, такие же, как описано в предыдущих разделах «Клетка AVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению» и «Способ получения клетки AVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению».

[0057] «Комбинированное применение клетки AVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитора иммунных контрольных точек»

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему стадию введения субъекту клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитора иммунных контрольных точек. Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для лечения рака, содержащей клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, где фармацевтическую композицию используют в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек. Настоящее изобретение также относится к клетке aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению для лечения рака, где клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению используют в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек. Настоящее изобретение также относится к применению клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению для получения фармацевтической композиции для применения в лечении рака, где фармацевтическую композицию применяют в комбинации с ингибитором иммунных контрольных точек. В способе, фармацевтической композиции, клетке или применении клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению экспрессирует CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент, и лиганд CD1d загружается на клеточную поверхность.

В настоящем описании «ингибитор иммунных контрольных точек» означает

лекарственное средство, которое стимулирует иммунитет посредством отмены супрессии иммунных клеток, вызванной молекулой иммунных контрольных точек. Примеры молекулы иммунных контрольных точек включают белок запрограммированной гибели клеток 1 (PD-1), цитотоксический Т-лимфоцит-ассоциированный белок 4 (CTLA-4), Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и домен муцина-3 (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3) и иммуноглобулиновый домен-содержащий супрессор активации Т-клеток V-типа. Иммунная контрольная точка, которая будет сформирована такой молекулой, называется иммунной контрольной точкой PD-1, иммунной контрольной точкой CTLA-4, иммунной контрольной точкой TIM-3, иммунной контрольной точкой LAG-3 и иммунной контрольной точкой VISTA. Ингибитор иммунных контрольных точек способен ингибировать функции иммунной контрольной точки, например, посредством связывания с молекулой иммунной контрольной точки или ее лигандом. Например, ингибитор иммунной контрольной точки PD-1 может ингибировать иммунную контрольную точку PD-1 посредством ингибирования связывания PD-1 с PD-L1 или PD-L2. Ингибитор иммунной контрольной точки CTLA-4 может ингибировать иммунную контрольную точку CTLA-4 посредством ингибирования связывания CTLA-4 с CD80 или CD86. Ингибитор иммунной контрольной точки TIM-3 может ингибировать иммунную контрольную точку TIM-3 посредством ингибирования связывания TIM-3 с галектином-9. Ингибитор иммунной контрольной точки LAG-3 может ингибировать иммунную контрольную точку LAG-3 посредством ингибирования связывания LAG-3 с молекулой МНС класса II. Ингибитор иммунной контрольной точки VISTA может ингибировать иммунную контрольную точку VISTA посредством ингибирования связывания VISTA с VSIG-3/IGSF11. Ингибитор иммунных контрольных точек относится к соединению, которое может ингибировать одну или более иммунных контрольных точек, таких как иммунная контрольная точка PD-1, иммунная контрольная точка CTLA-4, иммунная контрольная точка TIM-3, иммунная контрольная точка LAG3 и иммунная контрольная точка VISTA. Их примеры включают антитела, антигенсвязывающие белки и низкомолекулярные соединения. Некоторые антитела связываются либо с рецептором, либо с лигандом. Примеры антител, ингибирующих иммунную контрольную точку PD-1, включают анти-PD-1 антитела, анти-PD-L1 антитела и анти-PD-L2 антитела. Например, ниволумаб, пембролизумаб, MK-3475, AMP-224, пидилизумаб, AMP-514, ANB-011, BGB-A317, REGN-2810, HR301210, PF-06801591, JS-001, IBI-308, CBT-501, авелумаб, атезолизумаб, BMS-936559, LY-3300054, JNJ-61610588 и дурвалумаб. Примеры антител, ингибирующих иммунную контрольную точку CTLA-4, включают анти-CTLA-4 антитела, анти-CD80 антитела и анти-CD86 антитела. Например, можно использовать ипилимумаб и тремелиумаб. Примеры антител, ингибирующих иммунную контрольную точку TIM-3, включают анти-TIM-3 антитела и анти-галектин-9 антитела. Например, можно использовать MGB453. Примеры антител, ингибирующих иммунную контрольную точку VISTA, включают антитела, выбранные из группы, состоящей из анти-VISTA антител и анти-VSIG-3/IGSF11 антител. Например, можно использовать JNJ-61610588.

Альтернативно, в качестве низкомолекулярного соединения можно использовать AUPM-170.

[0058] Комбинированное применение клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитора иммунных контрольных точек может усиливать противоопухолевый эффект клетки aAVC-NY-ESO-1. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который можно использовать в комбинации с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело или анти-PD-L2 антитело. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, авелумаб, атезолизумаб или дурвалумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой ниволумаб или пембролизумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой пембролизумаб. В другом варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который можно использовать в комбинации с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки CTLA-4. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой анти-CTLA-4 антитело, анти-CD80 антитело или анти-CD86 антитело. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой ипилимумаб или тремелиумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой ниволумаб или пембролизумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек для комбинированного применения с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению представляет собой ипилимумаб.

[0059] Например, в способе лечения рака, включающем введение субъекту клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитора иммунных контрольных точек, в одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, подлежащий введению субъекту, представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1 или ингибитор иммунной контрольной точки CTLA-4. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, подлежащий введению субъекту, представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть

введен субъекту, представляет собой анти-PD-1 антитело, анти-PD-L1 антитело или анти-PD-L2 антитело. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть введен субъекту, представляет собой ниволумаб, пембролизумаб, авелумаб, атезолизумаб или дурвалумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть введен субъекту, представляет собой ниволумаб или пембролизумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который применяют в комбинации с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, представляет собой пембролизумаб. В еще одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который можно использовать в комбинации с клеткой aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, представляет собой ингибитор контрольной точки иммунного ответа CTLA-4. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть введен субъекту, представляет собой анти-CTLA-4 антитело, анти-CD80 антитело или анти-CD86 антитело. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть введен субъекту, представляет собой ипилимумаб или тремелидумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, который должен быть введен субъекту, представляет собой ниволумаб или пембролизумаб. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек, подлежащий введению субъекту, представляет собой ипилимумаб.

[0060] Клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитор иммунных контрольных точек можно вводить одновременно, последовательно, непрерывно или перекрывающимся образом. Сначала можно вводить либо клетку aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению, либо ингибитор иммунных контрольных точек. В одном варианте осуществления введение клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению можно начинать до введения ингибитора иммунных контрольных точек. В одном варианте осуществления введение ингибитора иммунных контрольных точек можно начинать до введения клетки aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению. Клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитор иммунных контрольных точек можно вводить независимо однократно или многократно. В одном варианте осуществления дополнительный противоопухолевый агент, такой как химиотерапевтический агент, можно использовать дополнительно в комбинации с монотерапией или сопутствующей терапией клетками aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению и ингибитором иммунных контрольных точек.

[0061] 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

[0062] Пример 1: противоопухолевый эффект клетки aAVC(3T3)-NY-ESO-1 мышинового типа

[0063] Пример 1-1: получение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 мышинового типа

Для подтверждения эффекта в качестве противоопухолевой вакцины, aAVC, нагруженную опухолевым антигеном NY-ESO-1, при оценке в системе *in vivo*, мРНК гена NY-ESO-1 и гена CD1d вводили в мышинные клетки NIH/3T3 (ATCC, номер по каталогу CRL-1658) для получения aAVC мышинового типа (также относится к aAVC(3T3)-NY-ESO-1).

[0064] Ген NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1) получали синтезом искусственного гена на основе аминокислотной последовательности человеческого NY-ESO-1, показанной в SEQ ID NO: 2. Ген NY-ESO-1 амплифицировали с помощью ПЦР с использованием праймеров, содержащих добавленную последовательность, комплементарную 15 нуклеотидам, включая последовательность узнавания HindIII или последовательность узнавания EcoRI плазмиды pGEM(R)-4Z (Promega Corp., номер по каталогу P2161). Амплифицированный ген NY-ESO-1 встраивали в сайт HindIII-EcoRI pGEM(R)-4Z с использованием набора для клонирования In-Fusion(R) HD (Takara Bio Inc., номер по каталогу 639648). Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pGEM-4Z-NY-ESO-1. Ген мышинового CD1d (ген, синтезированный искусственным синтезом генов на основе аминокислотной последовательности UniProt: P11609-1 (SEQ ID NO: 6)), состоящий из нуклеотидной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 5, вставляли в сайт HindIII-BamHI плазмиды pGEM(R)-4Z. Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pGEM-4Z-mCD1d. Плазмиду pGEM-4Z-NY-ESO-1 и плазмиду pGEM-4Z-mCD1d расщепляли EcoRI и BamHI соответственно для линейаризации этих плазмид. мРНК NY-ESO-1 и мРНК CD1d получали с использованием полученных линейаризованных плазмид в качестве матриц и с использованием набора для транскрипции mMESSAGE mMACHINE™ T7 ULTRA (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу AMB13455). Собирали клетки NIH/3T3, культивируемые 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. К клеточной суспензии добавляли мРНК NY-ESO-1 и мРНК CD1d с последующей электропорацией (режим, который обеспечивает раскрытие клеточных пор: напряжение: 150 В, длительность импульса: 8 мс, интервал между импульсами: 50 мс, количество импульсов: 2, затухание импульсов: 10%, полярность: +; режим, который обеспечивает необходимый уровень трансфекции: напряжение: 20 В, длительность импульса: 50 мс, интервал между импульсами: 50 мс, количество импульсов: ± 5 , затухание импульсов: 40%, полярность: +/-) с использованием электропоратора NEPA21 (Nepa Gene Co., Ltd.). Клетки собирали и облучали рентгеновскими лучами в дозе 30 Гр с использованием рентгеновского аппарата MBR-1520R-3 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd.). Клетки, полученные вышеописанным способом, обозначали как aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0065] Пример 1-2: способность aAVC(3T3)-NY-ESO-1 индуцировать NY-ESO-1-специфические Т-клетки у мышей

5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, суспендированных в растворе BICANATE

Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), вводили в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 6 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n=5 мышей). 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. Через 7 дней после введения клетки селезенки извлекали у мышей и инокулировали в количестве 4×10^5 клеток/лунку в планшет из набора для одноцветного ферментативного анализа мышиногo IFN- γ ELISPOT (Cellular Technology Limited, номер по каталогу mIFN γ p-2M/5). Для стимуляции NY-ESO-1-специфических Т-клеток использовали пептиды NY-ESO-1 (PepTivator NY-ESO-1 - премиум класса, человеческий (Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-095-381)) в виде перекрывающихся пептидов, покрывающих полноразмерную белковую последовательность NY-ESO-1, или пептид PAP (PepTivator PAP - исследовательский класс, человеческий (Miltenyi Biotec, номер по каталогу 130-096-767)), в качестве не антигенспецифического пептида, и клетки культивировали в течение 1 дня в условиях при 37°C и 5% CO₂. Количество клеток, продуцирующих IFN- γ , определяли подсчетом числа пятен на дне лунки. У мышей, которым вводили aAVC(3T3)-NY-ESO-1, количество клеток, продуцирующих IFN- γ , увеличивалось при стимуляции пептидом NY-ESO-1 (фиг. 1-1). Разница в числе пятен, отнесенных за счет стимуляции не антигенспецифическим пептидом PAP, представляет собой количество NY-ESO-1-специфических Т-клеток. Полученные результаты дают основание предположить, что введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 индуцирует NY-ESO-1-специфические Т-клетки.

[0066] Пример 1-3: антигенспецифический противоопухолевый эффект aAVC(3T3)-NY-ESO-1 у мышей с меланомой B16, содержащей клетки, экспрессирующие NY-ESO-1

5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, суспендированных в растворе BICANATE Injection (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), вводили в хвостовую вену каждой мыши-самке C57BL/6J в возрасте 8 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.) (n=10 мышей в каждой группе). 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. Через 14 дней после введения, 3×10^5 клеток меланомы B16-F10 (ATCC, номер по каталогу CRL-6475), суспендированных в D-PBS(-) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corp., номер по каталогу 045-29795) или 3×10^5 клеток меланомы B16-F10, экспрессирующих белок NY-ESO-1 (который был получен введением гена NY-ESO-1; далее относятся к клеткам B16-NY-ESO-1 или B16-NY-ESO-1), суспендированные в D-PBS(-), подкожно прививали мышам. День прививки опухолевых клеток принимали за день 0. Изменение объема опухолей оценивали в течение 20 дней. Введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 достоверно подавляло увеличение опухоли B16-NY-ESO-1, в то время как введение не подавляло увеличение опухоли B16-F10, не экспрессирующей NY-ESO-1 (фиг. 1-2). Полученные результаты позволяют предположить, что aAVC(3T3)-NY-ESO-1 обладает NY-ESO-1-специфическим противоопухолевым эффектом, основанным на индукции NY-ESO-1-специфического иммунитета.

[0067] Пример 1-4: исследование количества клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, проявляющих противоопухолевый эффект, у мышей с меланомой B16, содержащей

клетки, экспрессирующие NY-ESO-1

3×10^5 клеток B16-NY-ESO-1, суспендированных в D-PBS(-), прививали подкожно каждой мышце-самке C57BL/6J в возрасте 8 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 7 дней после прививки опухолевых клеток мышцей разделяли на 5 групп по 10 мышцей в каждой в зависимости от объема опухолей. Мышам вводили 5×10^2 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1/мышь, 5×10^3 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1/мышь, 5×10^4 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1/мышь или 5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1/мышь, суспендированных в носителе, в хвостовую вену в каждой группе. 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. День введения aAVC(3T3)-NY-ESO-1 принимали за день 0. Изменение объема опухолей оценивали в течение 10 дней. Поскольку две особи в группе с введением 5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1/мышь пали после введения, количество мышцей в этой группе составляло восемь на день 0 или позднее. Прогрессирование опухоли B16-NY-ESO-1 достоверно подавлялось в группах с введением 5×10^3 клеток/мышь или выше (фиг. 1-3). Уровень экспрессии NY-ESO-1 в aAVC(3T3)-NY-ESO-1, использованной в данном эксперименте, составлял 245 нг/ 1×10^6 клеток.

[0068] На основании результатов примера 1 было подтверждено, что клетки aAVC(3T3)-NY-ESO-1 мышечного типа проявляют NY-ESO-1-специфический противоопухолевый эффект посредством индукции NY-ESO-1-специфических Т-клеток при оценке в мышечной системе *in vivo*. Также можно ожидать, что у людей клетки aAVC-NY-ESO-1 человеческого типа будут демонстрировать противоопухолевый эффект, индуцируя естественный иммунитет, и также демонстрировать противоопухолевый эффект, основанный на приобретенном иммунитете, индуцируя антигенспецифический приобретенный иммунитет. Следовательно, были проведены исследования по получению клеток aAVC-NY-ESO-1 человеческого типа, как описано ниже, с целью разработки терапевтического препарата, проявляющего NY-ESO-1-специфический противоопухолевый эффект на клетки NY-ESO-1-экспрессирующей опухоли человека.

[0069] Пример 2: получение клеток aAVC-NY-ESO-1 человеческого типа

Клетки aAVC-NY-ESO-1 человеческого типа получали следующим способом: клетки aAVC, экспрессирующие NY-ESO-1, CD1d и Tet3G, готовили получением лентивирусов с использованием плазмид, загруженных генами NY-ESO-1, CD1d и Tet3, соответственно, и введением этих генов в клетки FreeStyle 293-F (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу R79007) с использованием лентивирусов.

[0070] Пример 2-1: получение лентивируса

(1) Конструирование плазмиды для приготовления лентивируса

Получали лентивирусную плазмиду pLVsyn-CMV (SEQ ID NO: 7). Ген NY-ESO-1, имеющий добавленную на 5'-конце последовательность узнавания EcoRI и добавленную на 3'-конце последовательность узнавания BamHI в гене NY-ESO-1 (SEQ ID NO: 1), получали с использованием искусственного синтеза гена. Ген NY-ESO-1, вырезанный рестриктазами EcoRI и BamHI, встраивали в сайт EcoRI-BamHI плазмиды pLVsyn-CMV.

Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pLVsyn-CMV-NY-ESO-1. Промотор TRE3G, вырезанный рестриктазами ClaI и EcoRI из плазмиды TRE3G, полученной сервисом искусственного синтеза генов на основе последовательности pTRE3G (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631173), вставляли в плазмиду pLVsyn-CMV-NY-ESO-1, из которой удалили CMV промотор рестриктазами ClaI и EcoRI. Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1.

[0071] Ген CD1d (SEQ ID NO: 3) конструировали на основе аминокислотной последовательности человеческого CD1d, показанной в SEQ ID NO: 4, и получали искусственным синтезом гена добавлением последовательности узнавания XhoI на 5'-конце и последовательности узнавания NotI на 3'-конце гена. Ген CD1d, вырезанный рестриктазами XhoI и NotI, встраивали в сайт XhoI-NotI плазмиды pLVsyn-CMV. Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pLVsyn-CMV-CD1d.

[0072] Ген Tet-On 3G получали искусственным синтезом гена добавлением последовательности узнавания XhoI на 5'-конце и последовательности узнавания NotI на 3'-конце к последовательности гена Tet-On 3G плазмиды pCMV-Tet3G (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631335). Ген Tet-On 3G, вырезанный рестриктазами XhoI и NotI, встраивали в сайт XhoI-NotI плазмиды pLVsyn-CMV. Полученную плазмиду обозначали как плазмиду pLVsyn-CMV-Tet3G.

[0073] (2) Получение лентивируса

Лентивирусы, загруженные геном NY-ESO-1, CD1d или Tet3G, получали с использованием плазмиды pLVsyn-CMV-NY-ESO-1, плазмиды pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1, плазмиды pLVsyn-CMV-CD1d и плазмиды pLVsyn-CMV-Tet3G, полученных на стадии (1). Полученные лентивирусы обозначали как лентивирус, загруженный CMV-NY-ESO-1, лентивирус, загруженный TRE3G-NY-ESO-1, лентивирус, загруженный CD1d, и лентивирус, загруженный Tet3G, соответственно.

[0074] 6 мкг плазмиды pLVsyn-CMV-NY-ESO-1, плазмиды pLVsyn-TRE3G-NY-ESO-1, плазмиды pLVsyn-CMV-CD1d или плазмиды pLVsyn-CMV-Tet3G и 18 мкл лентивирусной упаковочной смеси ViraPower (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу K497500) смешивали и добавляли к ней 3 мл OptiPROTM SFM (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 12309019) и перемешивали (A). 288 мкл реагента для трансфекции Lipofectamine 2000 CD (Thermo Fischer Scientific Inc., номер по каталогу 12566-014) и 12 мл OptiProTM SFM смешивали и оставляли на 5 мин (B). Смесь (A) и 3 мл смеси (B) смешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Затем проводили введение гена добавлением 3 мл/чашку смешанного раствора (A) и (B) к клеткам Lenti-XTM 293T (Takara Bio Inc., номер по каталогу 632180), инокулированных из расчета 5×10^6 клеток/чашку, на 100-мм чашку для культивирования клеток, обработанную TC Falcon(R) (Corning Inc., номер по каталогу 353003), на предыдущий день. Клетки Lenti-XTM 293T культивировали в условиях при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 10569010), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (SAFC Biosciences, номер по каталогу 12007C (продукт, облученный γ -лучами) и 0,1%

гентамицина (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 15750060). После введения гена клетки культивировали в течение 2 дней в аналогичных условиях, описанных выше. Извлекали культуральный супернатант, содержащий лентивирус, загруженный каждым геном. Культуральный супернатант центрифугировали при $840 \times g$ при 4°C в течение 10 мин. Супернатант фильтровали через фильтр 0,45 мкм (Merck KGaA, номер по каталогу SLHV033RS), смешивали с раствором для осаждения вирусов PEG-itTM (5 $\times$) (System Biosciences, LLC, номер по каталогу LV810A-1) в количестве, составляющем 1/4 от количества супернатанта, и выдерживали в течение ночи при 4°C . Смесь центрифугировали при $1500 \times g$ при 4°C в течение 30 мин для удаления супернатанта и повторно центрифугировали при $1500 \times g$ при 4°C в течение 5 мин для полного удаления супернатанта. Осадки суспендировали в 500 мкл DPBS (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 14190144) с получением лентивируса, загруженного CMV-NY-ESO-1, лентивируса, загруженного TRE3G-NY-ESO-1, лентивируса, загруженного CD1d, и лентивируса, загруженного Tet3G.

[0075] Пример 2-2: получение и клонирование инфицированных лентивирусом клеток

Клетки FreeStyle 293-F инфицировали каждым лентивирусом, полученным в примере 2-1. Популяцию клеток, инфицированную лентивирусом, загруженным CMV-NY-ESO-1, и лентивирусом, загруженным CD1d, обозначали как клеточный пул FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d. Популяцию клеток, инфицированную лентивирусом, загруженным TRE3G-NY-ESO-1, лентивирусом, загруженным CD1d, и лентивирусом, загруженным Tet3G, обозначали как клеточный пул FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d. Клонирование клеток из этих клеточных пулов осуществляли для получения множества клонов, полученных из каждого клеточного пула.

[0076] (1) Получение пула клеток FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d

Клетки FreeStyle 293-F инфицировали лентивирусом, загруженным CD1d, и лентивирусом, загруженным CMV-NY-ESO-1, с получением клеток FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1. В качестве методов инфицирования использовали два различных метода: метод инфицирования клеток лентивирусом, загруженным CD1d, и лентивирусом, загруженным CMV-NY-ESO-1, в одно и то же время (метод получения клеточного пула А), или метод инфицирования клеток лентивирусом, загруженным CD1d, и лентивирусом, загруженным CMV-NY-ESO-1, последовательно (метод получения клеточного пула С). Клетки FreeStyle 293-F культивировали в среде для экспрессии FreeStyle 293 (Thermo Fisher Scientific Inc., номер по каталогу 12338018), содержащей 0,1% гентамицина.

[0077] Получение клеточного пула А проводили следующим методом: клетки FreeStyle 293-F доводили до титра 1×10^6 клеток/мл и инокулировали из расчета 1 мл/лунку в 12-луночный плоскодонный планшет Falcon®, мультилуночный планшет для культивирования клеток с крышкой (Corning Inc., номер по каталогу 353043; далее именуемый 12-луночным планшетом). В каждую лунку добавляли по 50 мкл каждого или по 100 мкл каждого лентивируса, загруженного CD1d, и лентивируса, загруженного CMV-

NY-ESO-1, полученных в примере 2-1. После центрифугирования при $540\times g$ при комнатной температуре в течение 30 мин клетки осторожно суспендировали пипетированием и культивировали при встряхивании. После культивирования в течение нескольких дней клетки пассировали из 12-луночного планшета в поликарбонатную колбу Эрленмейера емкостью 125 мл с вентилируемой крышкой Corning® (Corning Inc., номер по каталогу 431143; далее именуемую как колба Эрленмейера емкостью 125 мл) и затем пассировали с соответствующими интервалами для получения клеточного пула А.

[0078] Получение клеточного пула С проводили следующим методом: клетки FreeStyle 293-F доводили до титра 1×10^6 клеток/мл и инокулировали в количестве 1 мл/лунку в 12-луночный плоскодонный планшет Falcon®, мультилуночный планшет для культивирования клеток с крышкой. В каждую лунку добавляли по 100 мкл лентивируса, загруженного CD1d, полученного в примере 2-1. После центрифугирования при $540\times g$ при комнатной температуре в течение 30 мин клетки осторожно суспендировали пипетированием и культивировали при встряхивании. После культивирования в течение нескольких дней клетки пассировали из 12-луночного планшета в колбу емкостью 125 мл и затем пассировали с соответствующими интервалами для получения клеточного пула FreeStyle 293F_CD1d (называемого клеточным пулом В). Клеточный пул В снова пассировали в 12-луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 50 мкл или 200 мкл лентивируса, загруженного CMV-NY-ESO-1. Второе инфицирование лентивирусом проводили с использованием тех же процедур, что и первое. После культивирования в течение нескольких дней клетки пассировали из 12-луночного планшета в колбу Эрленмейера емкостью 125 мл и далее пассировали с соответствующими интервалами для получения клеточного пула С. Клеточный пул А и клеточный пул С использовали в клеточном пуле FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d.

[0079] (2) Получение клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d

Клеточный пул В, полученный в процессе приготовления клеточного пула С по способу на стадии (1), снова инокулировали в 12-луночный планшет. В каждую лунку добавляли по 40 мкл или 200 мкл каждого лентивируса, загруженного TRE3G-NY-ESO-1, и лентивируса, загруженного Tet3G, полученных в примере 2-1. Инфицирование лентивирусом проводили в соответствии с процедурами, описанными на стадии (1). Через день клетки переносили из 12-луночного планшета в колбу Эрленмейера емкостью 125 мл и затем пассировали с соответствующими интервалами для получения клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0080] (3) Стабильность экспрессии NY-ESO-1 и характеристики культуры в клеточном пуле

Исследовали временную динамику уровней экспрессии NY-ESO-1 после инфицирования лентивирусом (фиг. 2-1) и долю NY-ESO-1-положительных клеток (фиг. 2-2) для клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d и клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d, полученных на стадии (1) и (2). Экспрессию NY-ESO-1 анализировали на день 3, 7, 10 и 14 после инфицирования для клеточного пула

FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d. Клеточный пул FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d анализировали на день 7 и 14 после инфицирования. За 2 дня до анализа в среду добавляли доксициклин (Takara Bio Inc., номер по каталогу 631311) в конечной концентрации 100 нг/мл для индукции экспрессии через систему Tet-On. Экспрессию NY-ESO-1 измеряли с помощью ELISA и проточной цитометрии. Измерение с помощью ELISA выполняли в соответствии с общей процедурой постановки сэндвич ELISA с использованием анти-NY-ESO-1 антитела (Millipore Corp., номер по каталогу MABC1151) в качестве антитела для иммобилизации, анти-CTAG1B антитела (Abcam plc, номер по каталогу ab183740) в качестве первичного антитела и IgG кроличье антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (R&D Systems, Inc., номер по каталогу HAF008), в качестве вторичного антитела. Анализ с использованием проточной цитометрии выполняли в соответствии с общим методом постановки анализа с использованием анти-NY-ESO-1 антитела в качестве первичного антитела, APC козьего антимышиного IgG антитела (Life Technologies Corp., номер по каталогу A10539) в качестве вторичного антитела, и FACSVerseTM (BD Biosciences). Во время пассажей после инфицирования в качестве характеристики культуры выполняли оценку выживаемости (фиг. 2-3) и расчет времени удвоения клеток (фиг. 2-4).

[0081] Как показано в отношении уровня экспрессии на фиг. 2-1 и доли NY-ESO-1-положительных клеток на фиг. 2-2, клеточный пул FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d демонстрировал существенно более высокие значения как уровня экспрессии NY-ESO-1, так и доли NY-ESO-1-положительных клеток по сравнению с клеточным пулом FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d сразу после инфицирования лентивирусом, в то время, как снижение уровня экспрессии и доли NY-ESO-1-положительных клеток было обнаружено по мере протекания культивирования. С другой стороны, такого снижения уровня экспрессии и доли NY-ESO-1-положительных клеток не наблюдали в клеточном пуле FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0082] Как показано в отношении выживаемости на фиг. 2-3 и времени удвоения клеток на фиг. 2-4, то клеточный пул FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d показал снижение выживаемости и увеличение времени удвоения в течение 7 дней после инфицирования лентивирусом. Общий уровень экспрессии NY-ESO-1 и доли NY-ESO-1-положительных клеток в клеточном пуле предположительно снижались по мере протекания культивирования из-за увеличения времени удвоения, связанного со снижением выживаемости клеток с высокой экспрессией NY-ESO-1. С другой стороны, такие вариации характеристик культуры не наблюдали в клеточном пуле FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d.

[0083] (4) Клонирование

Клонирование одиночных клеток проводили методом лимитирующих разведений из клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d и клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d, полученных на стадии (1) и (2). Отбирали клоны, стабильно экспрессирующие все гены. Клетки инокулировали из расчета 1 клетка/лунку в

96-луночный планшет и пассировали в соответствии с пролиферацией клеток, так что имела место индукция пролиферации клеток. Уровни экспрессии белка NY-ESO-1 и белка CD1d в пролиферирующих клетках измеряли с помощью ELISA для NY-ESO-1 и с помощью проточной цитометрии для CD1d для отбора клонов, стабильно экспрессирующих белки NY-ESO-1 и CD1d. Экспрессию NY-ESO-1 в клонах, полученных из клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d, индуцировали с помощью системы Tet-On добавлением к среде доксициклина с конечной концентрацией 100 нг/мл, и проводили оценку. Измерение с помощью ELISA проводили в соответствии с общей процедурой постановки сэндвич ELISA с использованием анти-NY-ESO-1 антитела в качестве антитела для иммобилизации, анти-CTAG1B антитела в качестве первичного антитела и кроличьего IgG антитела, конъюгированного с пероксидазой хрена, в качестве вторичного антитела. Измерение с помощью проточной цитометрии выполняли в соответствии с общей процедурой постановки анализа с использованием мышиного антитела APC против человеческого CD1d (BD Biosciences, номер по каталогу 563505) и FACSVerse™ (BD Biosciences).

[0084] (5) Уровень экспрессии NY-ESO-1 в полученном клоне

Уровень экспрессии NY-ESO-1 определяли относительно клонов, полученных из клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d, или клонов, полученных из клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d, полученных на стадии (4). Измерение проводили с использованием метода ELISA, описанного на стадии (4) (фиг. 3).

[0085] Как показано на фиг. 3, уровень экспрессии NY-ESO-1 в клонах, выделенных из клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d, был очень низким и составлял максимум 88 нг/10⁶ клеток. С другой стороны, уровень экспрессии клонов, происходящих из клеточного пула FreeStyle 293F_Tet-on_NY-ESO-1_CD1d, в значительной степени отличался среди клонов, что дает возможность отбора клона, имеющего желаемый уровень экспрессии. Кроме того, большее число клонов, чем клонов, полученных из клеточного пула FreeStyle 293F_CMV_NY-ESO-1_CD1d, демонстрировало более высокий уровень экспрессии.

[0086] Пример 3: эффект комбинированного применения aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-PD-1 антитела

(1) Эффект комбинированного применения у мышей с меланомой B16, содержащей клетки, экспрессирующие NY-ESO-1

3×10⁵ клеток B16-NY-ESO-1, суспендированных в D-PBS(-), прививали подкожно каждой мышце-самке C57BL/6J в возрасте 9 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 7 дней после прививки опухолевых клеток мышей разделяли на 4 группы по 10 мышей в каждой в зависимости от объема опухолей. 0,1 мг анти-PD-1 антитела (InVivoMAb против мышиного PD-1 (CD279), Bio X Cell, номер по каталогу BE0089) вводили мышам внутрибрюшинно. Антитело вводили в общей сложности 5 раз дважды в неделю с интервалом 3-4 дня. Через 3 дня после начала введения антитела 5×10⁴ клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, суспендированных в носителе BICANATE Injection, вводили

мышам в хвостовую вену. 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. День введения aAVC(3T3)-NY-ESO-1 принимали на день 0. Изменение объема опухолей оценивали до дня 11. Введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1+изотипное антитела и введение анти-PD-1 антитела подавляло прогрессирование опухоли B16-NY-ESO-1. Комбинированное введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-PD-1 антитела более заметно подавляло прогрессирование опухоли B16-NY-ESO-1, чем введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1+изотипное антитело и введение анти-PD-1 антитела (фиг. 4-1). Полученные результаты дают основание предположить, что комбинированное применение с анти-PD-1 антителом усиливает противоопухолевый эффект aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0087] (2) Эффект комбинированного применения у мышей с колоректальной карциномой CT26, содержащей клетки, экспрессирующие NY-ESO-1

7×10^5 клеток колоректальной карциномы CT26, экспрессирующей белок NY-ESO-1 (ATCC, номер по каталогу CRL-2638) (далее именуемые клетками CT26-NY-ESO-1), полученных введением гена NY-ESO-1, суспендированных в D-PBS(-), подкожно прививали каждой мышам-самке BALB/c в возрасте 7 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 14 дней после прививки клеток мышам разделяли на 4 группы по 8 мышам в каждой в зависимости от объема опухолей. Мышам внутрибрюшинно вводили по 0,1 мг анти-PD-1 антитела. Группе, не получавшей антитело, не вводили антитело. Антитело вводили в общей сложности 4 раза дважды в неделю с интервалом 3-4 дня. В день начала введения антитела, 5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, суспендированных в носителе BICANATE Injection вводили мышам в хвостовую вену. 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. День введения aAVC(3T3)-NY-ESO-1 принимали за день 0. Изменение объема опухолей оценивали до дня 14. Введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 одной и введение одного анти-PD-1 антитела подавляло прогрессирование опухоли CT26-NY-ESO-1, тогда как комбинированное введение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-PD-1 антитела более заметно подавляло прогрессирование опухолей CT26-NY-ESO-1, чем введение каждого агента по отдельности (фиг. 4-2). Полученные результаты дают основание предположить, что комбинированное применение с анти-PD-1 антителом усиливает противоопухолевый эффект aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

[0088] Пример 4: эффект комбинированного применения aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-CTLA-4 антитела

7×10^5 клеток CT26-NY-ESO-1, суспендированных в D-PBS(-), подкожно прививали каждой мышам-самке BALB/c в возрасте 7 недель (Charles River Laboratories Japan, Inc.). Через 7 дней после прививки опухолевых клеток мышам разделяли на 4 группы по 10 мышам в каждой в зависимости от объема опухолей. Через 7 дней после деления на группы мышам внутрибрюшинно вводили по 0,15 мг анти-CTLA-4 антитела (InVivoMAb против мышиного CTLA-4 (CD152), Bio X Cell, номер по каталогу BE0164). Группе, не получавшей антитело, не вводили антитело. Антитело вводили в общей сложности 5 раз

дважды в неделю с интервалом 3-4 дня. В день начала введения антитела, 5×10^5 клеток aAVC(3T3)-NY-ESO-1, суспендированных в носителе BICANATE Injection вводили мышам в хвостовую вену. Одна мышь в группе с комбинированным введением клетки AVC(3T3)-NY-ESO-1+анти-CTLA-4 антитела пала после введения aAVC(3T3)-NY-ESO-1. 200 мкл раствора BICANATE Injection вводили мышам контрольной группы. День инокуляции опухолевых клеток принимали за день 0. Изменение объема опухоли оценивали в течение 32 дней. Введение только aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и введение только анти-CTLA-4 антитела подавляло прогрессирование опухоли CT26-NY-ESO-1, тогда как комбинированное применение aAVC(3T3)-NY-ESO-1 и анти-CTLA-4 антитела более заметно подавляло прогрессирование CT26-NY-ESO-1, чем введение каждого агента по отдельности (фиг. 5). Полученные результаты дают основание предположить, что комбинированное применение с анти-CTLA-4 антителом усиливает противоопухолевый эффект aAVC(3T3)-NY-ESO-1.

Промышленная применимость

[0089] Можно ожидать, что клетка aAVC-NY-ESO-1 по настоящему изобретению будет пригодной в лечении рака.

Свободный текст списка последовательностей

[0090] Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 1 в списке последовательностей, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую белок NY-ESO-1 человека, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 2 в списке последовательностей, представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 1. Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 3 в списке последовательностей, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую человеческий белок CD1d, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 4 в списке последовательностей, представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 3. Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 5 в списке последовательностей, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую мышинный белок CD1d, и аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 6 в списке последовательностей представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью SEQ ID NO: 5. Нуклеотидная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 7 в списке последовательностей, представляет собой нуклеотидную последовательность pLVsyn-CMV. Эти последовательности описаны в описании «Искусственная последовательность» в цифровом заголовке <223> списка последовательностей, приведенного ниже.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Клетка человеческого происхождения, содержащая полинуклеотид, кодирующий CD1d, и полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1, или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.
2. Клетка по п.1, где NY-ESO-1 представляет собой NY-ESO-1 человека.
3. Клетка по пп.1 или 2, где CD1d представляет собой CD1d человека.
4. Клетка по любому из пп.1-3, где индуцибельный промотор представляет собой промотор, индуцируемый лекарственным препаратом.
5. Клетка по п.4, где промотор, индуцируемый лекарственным препаратом, представляет собой промотор, индуцируемый тетрациклином.
6. Клетка по п.5, где промотор, индуцируемый тетрациклином, представляет собой промотор TRE3G.
7. Клетка по любому из пп.1-6, где клетка человеческого происхождения представляет собой нормальную клетку.
8. Клетка по п.7, где клетка человеческого происхождения представляет собой клетку, полученную из клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293).
9. Клетка по любому из пп.1-8, экспрессирующая CD1d и NY-ESO-1 или его фрагмент.
10. Клетка по п.9, где уровень экспрессии NY-ESO-1 или его фрагмента составляет от 245 нг до 45000 нг в расчете на 10^6 клеток.
11. Клетка по пп.9 или 10, где лиганд CD1d загружается на клеточную поверхность.
12. Клетка по п.11, где лиганд CD1d представляет собой α -GalCer.
13. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по пп.11 или 12.
14. Фармацевтическая композиция по п.13 для применения в лечении рака.
15. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту клетки по пп.11 или 12.
16. Клетка по пп.11 или 12 для лечения рака.
17. Применение клетки по пп.11 или 12 для получения фармацевтической композиции для лечения рака.
18. Способ получения клетки для применения в лечении рака, включающий стадию культивирования клетки по любому из пп.1-8 в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента.
19. Способ по п.18, дополнительно включающий стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность.
20. Способ получения клетки для применения в лечении рака, включающий стадию:

введения полинуклеотида, кодирующего CD1d, и полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент операбельно связан с индуцибельным

промотором; или

введения полинуклеотида, кодирующего NY-ESO-1 или его фрагмент, в клетку человеческого происхождения, эндогенно экспрессирующую CD1d, где полинуклеотид, кодирующий NY-ESO-1 или его фрагмент, операбельно связан с индуцибельным промотором.

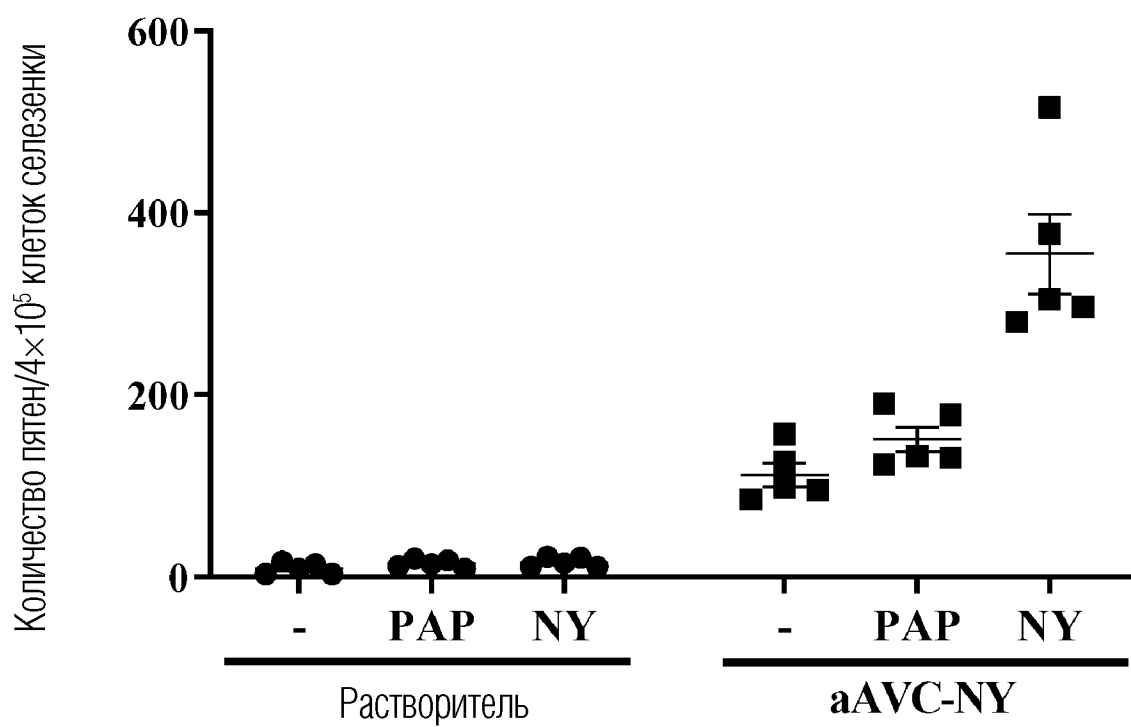
21. Способ по п.20, дополнительно включающий стадию культивирования клетки, полученной на стадии в присутствии индуктора индуцибельного промотора, тем самым индуцируя экспрессию NY-ESO-1 или его фрагмента.

22. Способ по п.21, дополнительно включающий стадию загрузки α -GalCer на клеточную поверхность.

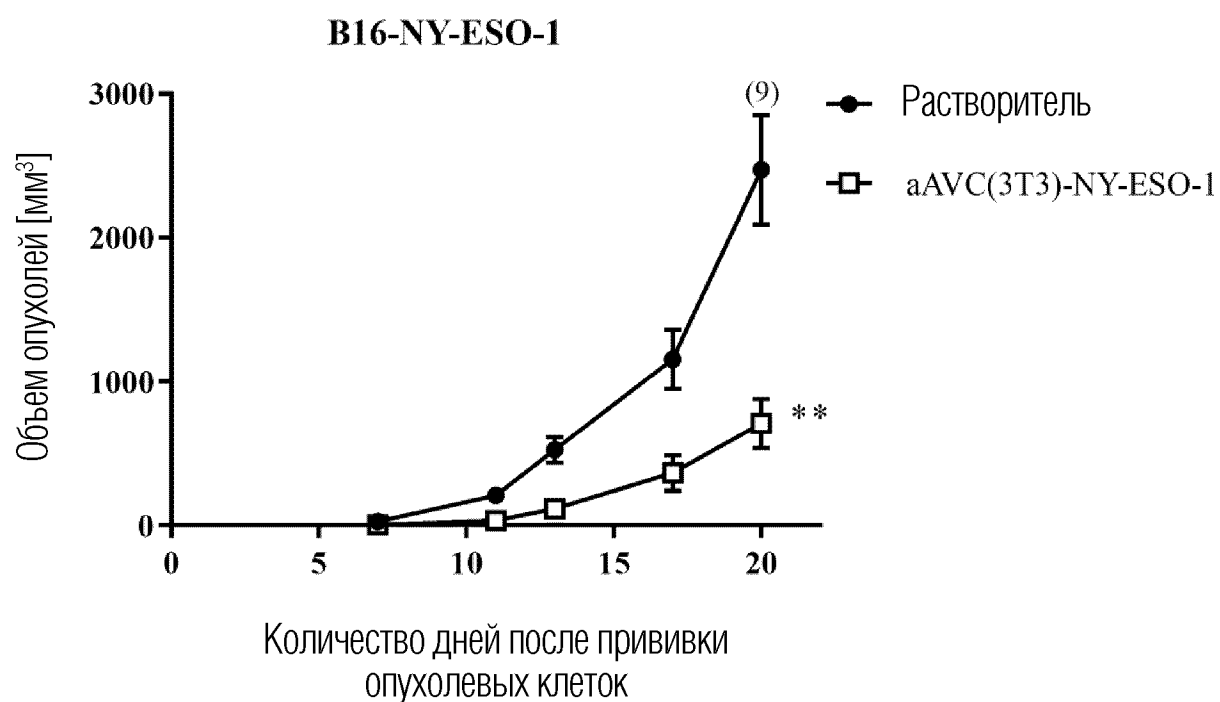
23. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту клетки по пп.11 или 12 и ингибитора иммунных контрольных точек.

24. Способ по п.23, в котором ингибитор иммунных контрольных точек представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки PD-1 или ингибитор иммунной контрольной точки CTLA-4.

ФИГ. 1-1

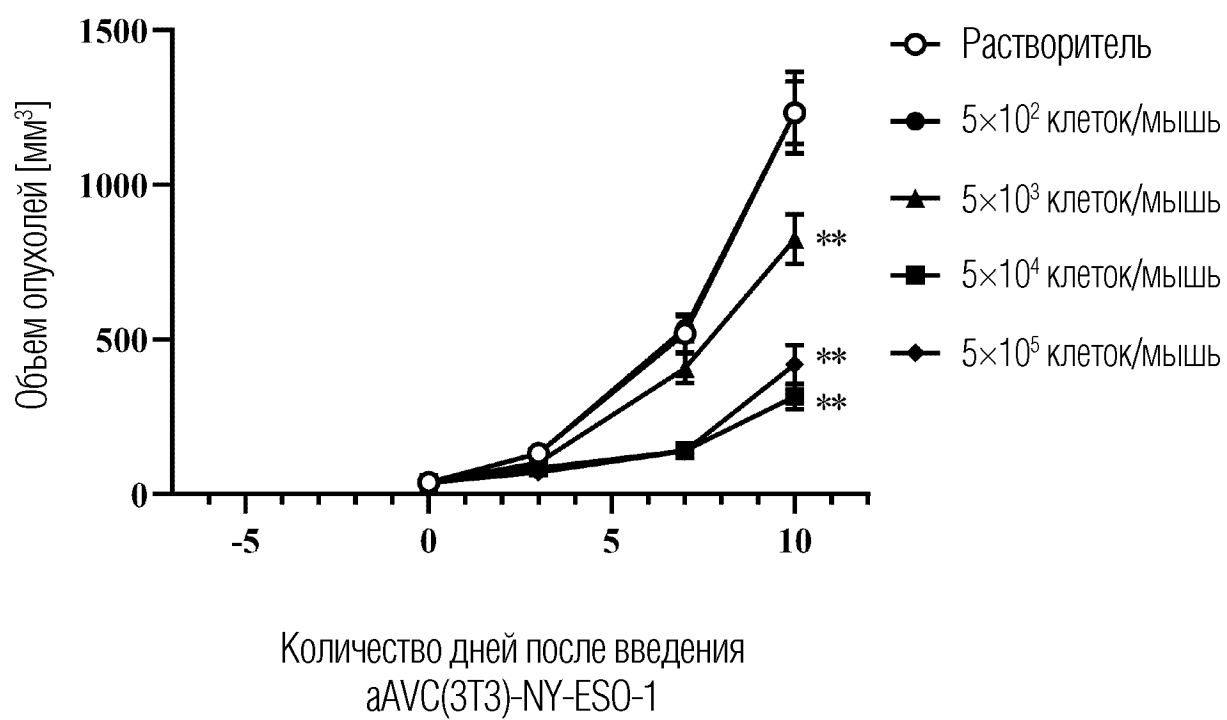
IFN- γ -продуцирующая Т-клетка

ФИГ. 1-2

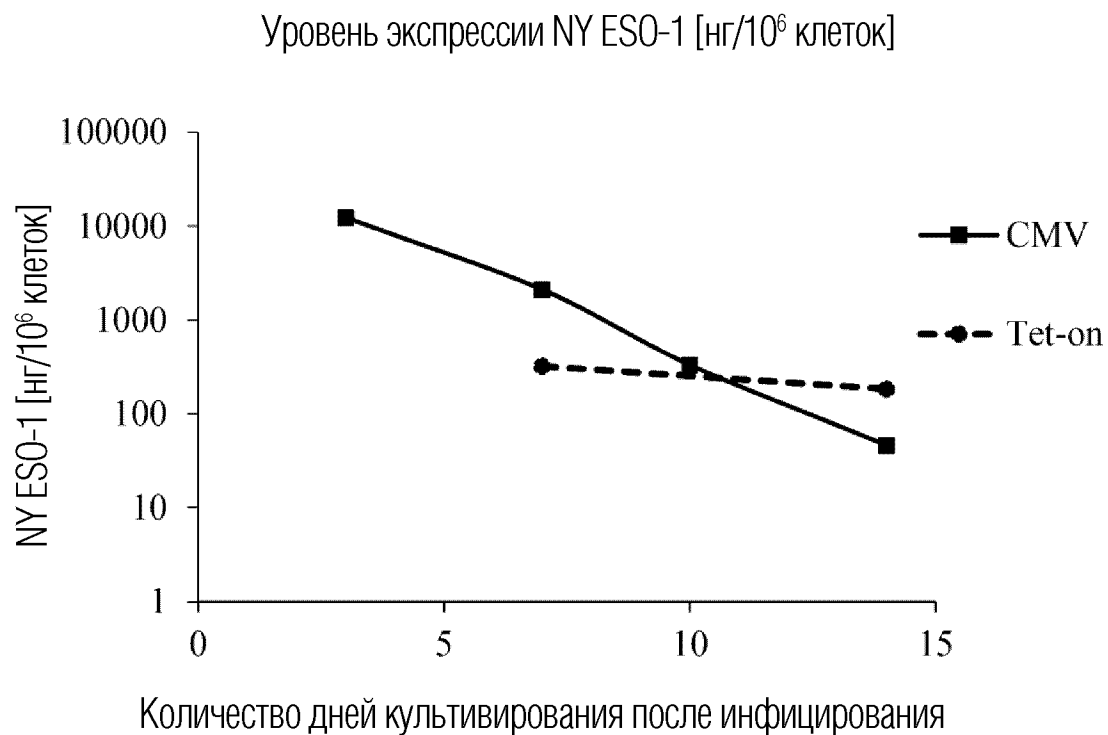


3/8

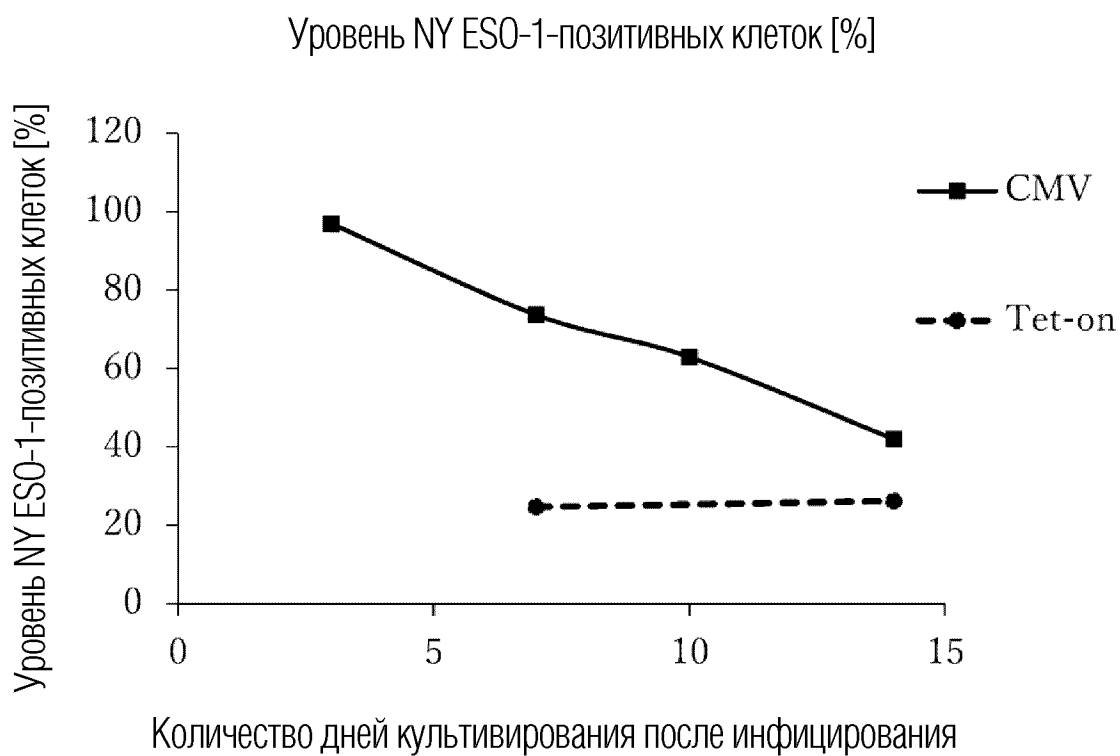
ФИГ. 1-3



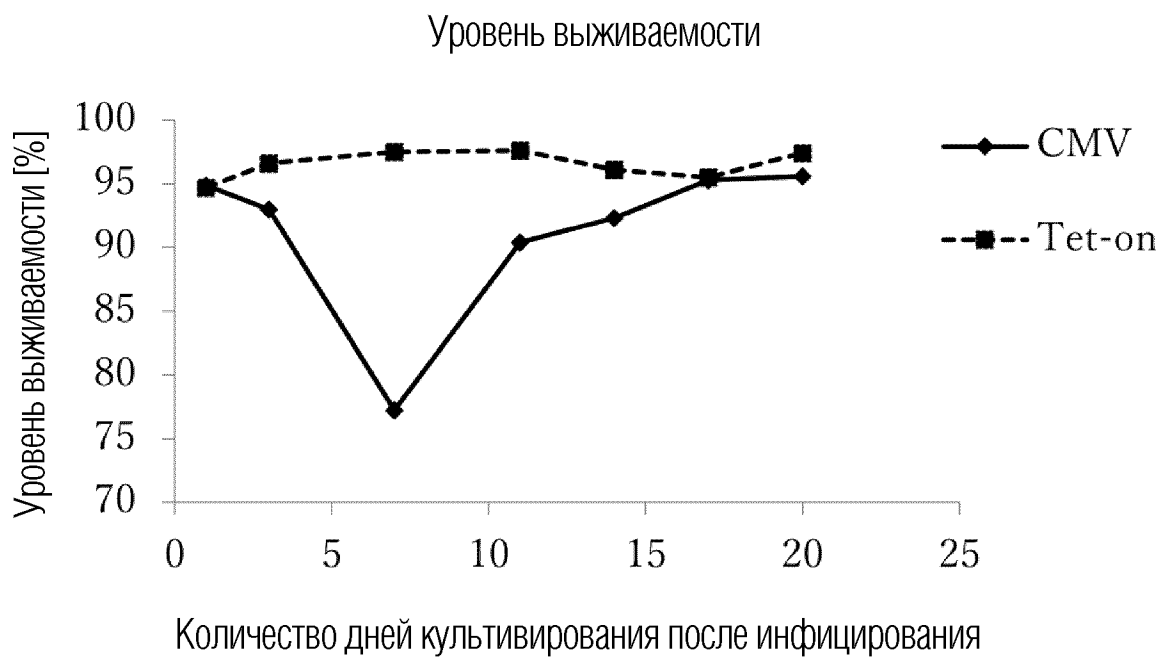
ФИГ. 2-1



ФИГ. 2-2



5/8
ФИГ. 2-3



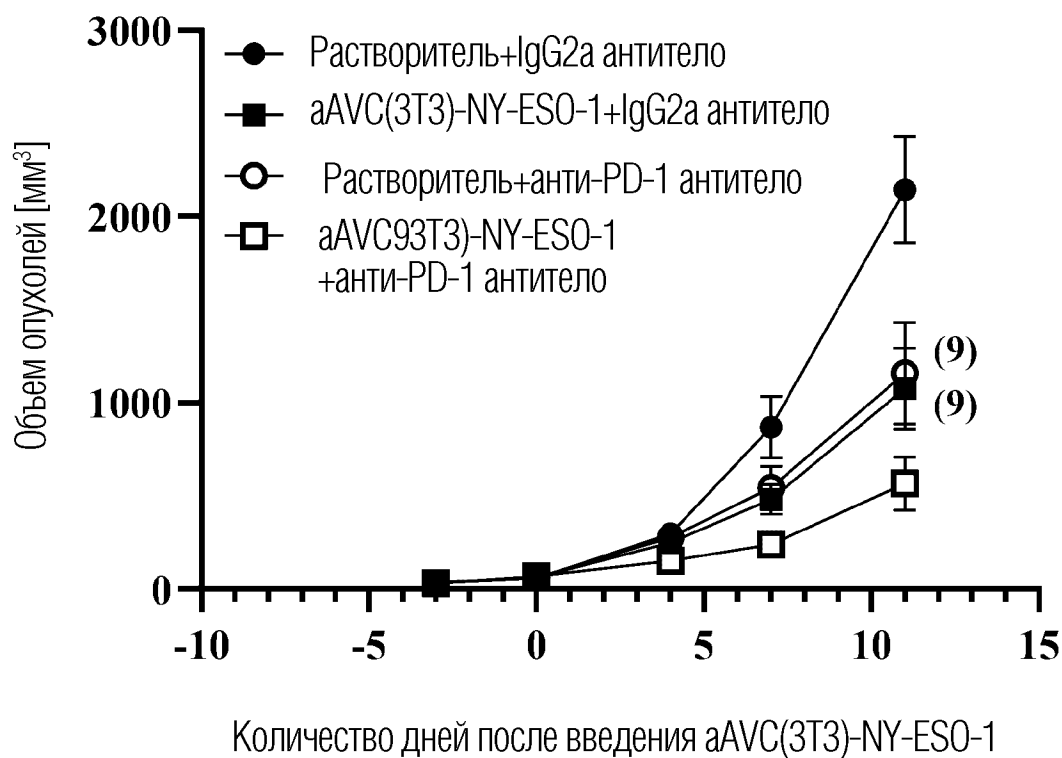
ФИГ. 2-4



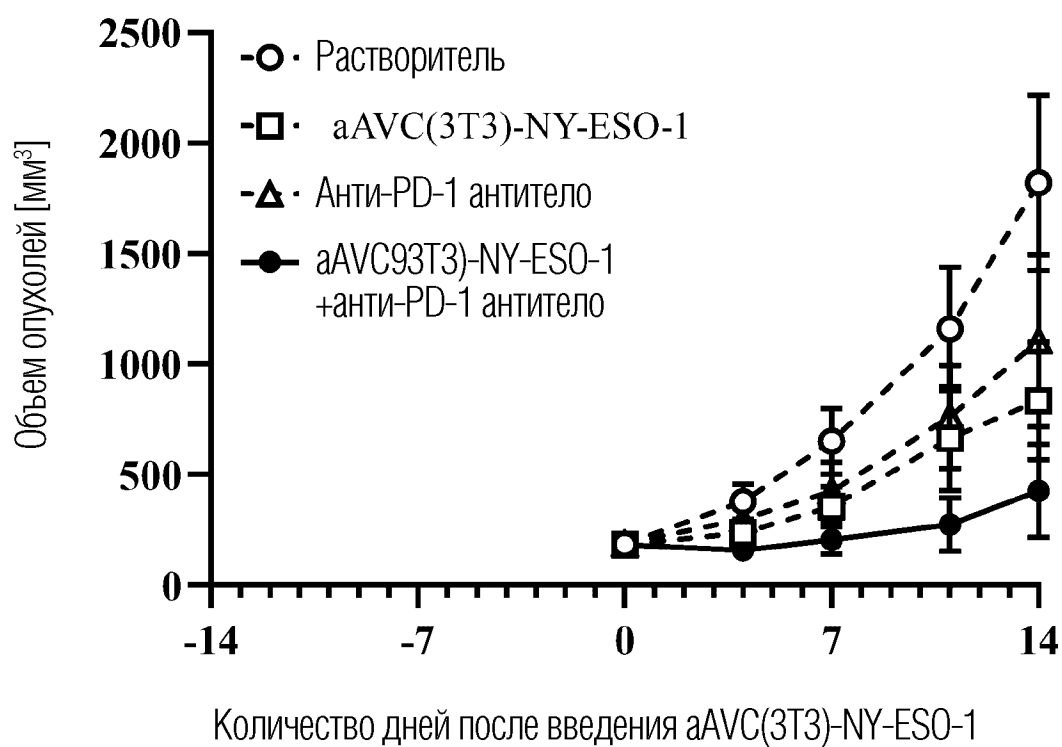
ФИГ. 3

Промотор	№.	Уровень экспрессии NY ESO-1 [нг/10 ⁶ клеток]	Промотор	№.	Уровень экспрессии NY ESO-1 [нг/10 ⁶ клеток]
CMV	#01	68	Tet-on	#01	331
	#02	74		#02	106
	#03	25		#03	772
	#04	12		#04	308
	#05	11		#05	2503
	#06	10		#06	2573
	#07	26		#07	111
	#08	15		#08	7813
	#09	45		#09	7324
	#10	23		#10	7281
	#11	18		#11	17021
	#12	42		#12	710
	#13	10		#13	1094
	#14	15		#14	32
	#15	47		#15	19413
	#16	88		#16	43890
	#17	49		#17	1519
				#18	17720
				#19	114
				#20	42
				#21	3460
				#22	629
				#23	16
				#24	5
				#25	844
				#26	1566
				#27	29514
				#28	12313
				#29	995
				#30	33557
				#31	34079
				#32	29538
				#33	30602
				#34	6495
				#35	232
				#36	295
				#37	340
				#38	291
				#39	2550
				#40	747
				#41	2397
				#42	1814
				#43	683

ФИГ. 4-1



ФИГ. 4-2



ФИГ. 5

