

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048217**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.07**

**(21)** Номер заявки  
**202190439**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.08.08**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/0783** (2010.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 14/74** (2006.01)  
**C07K 14/78** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 17/00** (2006.01)  
**C12N 5/074** (2010.01)

---

**(54) СПОСОБ ПРОДУЦИРОВАНИЯ CD3-ПОЗИТИВНЫХ КЛЕТОК**

---

**(31)** 2018-151580; 2019-042666; 2019-117878

**(32)** 2018.08.10; 2019.03.08; 2019.06.25

**(33)** JP

**(43)** 2021.05.20

**(86)** PCT/JP2019/031390

**(87)** WO 2020/032179 2020.02.13

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**КИОТО ЮНИВЕРСИТИ; ТАКЕДА  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КОМПАНИ  
ЛИМИТЕД (JP)**

**(72)** Изобретатель:  
**Канеко Син, Каваи Йохеи, Арима  
Сугуру, Такигути Маико, Накаяма  
Кадзухиде, Кассаи Йосиаки, Хаяси  
Акира (JP)**

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

**(56)** JP-A-2005124568  
PODACK, Eckhard R. et al., "CD30-Governor  
of Memory T Cells?", ANNALS NEW YORK  
ACADEMY OF SCIENCES, 2002, vol. 975, p.  
101-113, page 103, lines 20-29, page 105, line 2 from  
the bottom, page 107, fig. 7  
WO-A1-2007040105  
JP-A-2008035864  
WO-A1-2017221975  
JP-A-2018514204  
JP-A-2018506983

---

**(57)** Для обеспечения стабильного продуцирования дифференцированных Т-клеток в изобретении представлены способ получения, или способ экспансии в культуре, или набор для экспансии в культуре CD3-позитивных клеток, у которых на клеточной мембране экспрессируется Т-клеточный маркер CD3.

---

**B1**

**048217**

**048217**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способу продуцирования или способу экспансии в культуре CD3-позитивных клеток (или CD3-позитивных CD197-позитивных клеток), включающему этап культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта, и агониста CD30, и к набору для экспансии в культуре CD3-позитивных клеток. Настоящее изобретение также относится к способу поддержания CD3-позитивных клеток в виде CD3-позитивных CD197-позитивных клеток, включающему этап стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивных клетках, и к набору для поддержания CD3-позитивных клеток в виде CD3-позитивных CD197-позитивных клеток.

### Уровень техники

Выяснилось, что иммунотерапия демонстрирует сильный эффект продления жизни даже при раковых заболеваниях, для которых обычные методы лечения неэффективны, и становится ведущей терапией в лечении рака. CART терапия, включающая перенос аутологичных Т-клеток, трансфицированных геном анти-CD19 химерного антигенного рецептора (CAR), демонстрирует высокую частоту полной ремиссии В-клеточных злокачественных новообразований, и в 2017 году FDA одобрило два вида CART терапии для В-клеточного острого лимфобластного лейкоза и диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы. Кроме того, проводится несколько клинических испытаний TCR-Т-клеточной терапии, включающей введение гена Т-клеточного рецептора (TCR), распознающего антиген раковых клеток. Хотя эти виды терапии лечения генетически модифицированными Т-клетками с использованием Т-клеток самого пациента (собственных) показывают чрезвычайно хорошие клинические результаты, они включают транспортировку, модификацию генов, культивирование Т-клеток и т.п. Такие сложные процессы, занимающие от нескольких недель и более, не позволяют снизить затраты и обеспечить контроль качества. Более того, поскольку они приводят к потере возможности лечения пациентов с быстрорастущим раком, имеется высокая потребность в разработке стандартной терапии аллогенными Т-клетками. В качестве способа экспансии в культуре Т-клеток, полученных от пациентов, описаны способ продуцирования CD8-позитивных Тс1-лимфоцитов или CD8-позитивных Тс2-лимфоцитов путем контактирования популяции Т-клеток с агонистическим антителом к CD3 и агонистическим антителом к CD30 (патентный документ 1) и способ экспансии в культуре опухолеспецифических Т-клеток путем получения популяции Т-клеток от больного раком и приведения в контакт этой популяции Т-клеток с агонистическим антителом к CD3, анти-CD28 антителом и ингибитором VEGF (патентный документ 2). Однако Т-клетки, полученные от здорового донора или пациентов, имеют ограниченную пролиферативную способность, и количество генетически модифицированных Т-клеток, которые можно получить из Т-клеток, которые могут быть выделены за один сеанс афереза, ограничено. Кроме того, имеются сообщения о том, что экспансия в культуре Т-клеток путем стимуляции TCR вызывает временное повышение экспрессии CCR7 (CD197), который является поверхностным маркером наивных клеток и Т-клеток памяти, которое впоследствии исчезает в течение нескольких дней (непатентный документ 1). Согласно другому сообщению наличие Т-клеток памяти ("персистенция Т-клеток") является важным фактором для противоопухолевой активности *in vivo*, и высокий противоопухолевый эффект *in vivo* наблюдали при увеличении количества вводимых CART клеток, которые представляют собой Т-клетки памяти (непатентный документ 2). Следовательно, низкая экспрессия CD197 в популяции клеток, полученной путем экспансии в культуре Т-клеток, не подходит для лечения рака.

С другой стороны, поскольку Т-клетки, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток, таких как iPS-клетки, ES-клетки и т.п. (дифференцированные Т-клетки), получают из плюрипотентных стволовых клеток, которые теоретически могут пролиферировать бесконечно, то, теоретически, модифицированные Т-клетки можно продуцировать бесконечно. Однако способ экспансии в культуре iPS-клеток с сохранением плюрипотентности является дорогостоящим и технически сложным. Следовательно, способ получения дифференцированных Т-клеток, в частности CD197-позитивных Т-клеток, путем пролиферации большого количества iPS-клеток имеет ограничение. В результате возникает потребность в другом подходе для получения большого количества Т-клеток, в частности CD197-позитивных Т-клеток.

### Список документов

Патентные документы:

патентный документ 1: WO 2003/038062;

патентный документ 2: US-A-2014/0255368.

Непатентные документы:

непатентный документ 1: Sallusto et al., Eur. J. Immunol., vol. 29, 2037-2045, 1999;

непатентный документ 2: Kaartinen et al., Cytotherapy, vol. 19, 689-702, 2017.

### Сущность изобретения

#### Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является стабильная поставка дифференцированных Т-клеток, в частности CD197-позитивных Т-клеток, и настоящее изобретение относится к способу продуцирования, способу экспансии в культуре и к набору для экспансии в культуре CD3-позитивных клеток с Т-клеточным маркером CD3, экспрессируемым на клеточной мембране. Другой целью настоящего изобретения

обретения является предоставление способа поддержания CD197-позитивных Т-клеток и набора для поддержания CD197-позитивных Т-клеток.

### Решение проблемы

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования в попытке достичь поставленных целей и обнаружили, что достижение эффективной пролиферации CD8-позитивных Т-клеток, полученных из iPS-клеток, трансфицированных геном TCR (CD8-позитивных Т-клеток, происходящих из iPS-клеток), возможно путем культивирования Т-клеток в среде, содержащей агонистическое антитело к CD30, в культуральном контейнере, на котором иммобилизованы агонистическое антитело к CD3 и РетроНектин (RetroNectin, зарегистрированный товарный знак). Кроме того, было показано, что эффективность пролиферации Т-клеток и антигенспецифическая цитотоксическая активность сохраняются даже в случае многократной пролиферации CD8-позитивных Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, в процессе культивирования. Кроме того, было обнаружено, что при культивировании CD8-позитивных Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, с использованием агонистического антитела к CD30 скорость экспрессии CD197 становится высокой, в отличие от ситуации, когда агонистическое антитело к CD30 не используется, и пролиферированные Т-клетки присутствуют в виде Т-клеток центральной памяти. Более того, аналогично CD8-позитивным Т-клеткам, происходящим из iPS-клеток, эффективная пролиферация CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, и CD8-позитивных Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, трансфицированных геном анти-CD19-CAR (анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток), также возможна путем добавления агонистического антитела к CD30 в среду в культуральном контейнере, на котором иммобилизованы агонистическое антитело к CD3/РетроНектин (зарегистрированный торговый знак). Также было обнаружено, что, когда CD8-позитивные Т-клетки, полученные из периферической крови человека, или анти-CD19-CART клетки, происходящие из iPS-клеток, культивируют с использованием агонистического антитела к CD30, экспрессия CD197 сохраняется в течение длительного времени, и CD8-позитивные Т-клетки, полученные из периферической крови человека, могут выживать *in vivo* в течение длительного времени в отличие от ситуации, когда агонистическое антитело к CD30 не используется. Настоящее изобретение основано на вышеуказанных открытиях.

Соответственно, согласно настоящему изобретению, предлагается следующее.

[1] Способ продуцирования CD3-позитивной клетки, включающий этап (I) культивирования CD3-позитивной клетки в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта, и агониста CD30.

[2] Способ по [1], дополнительно включающий этап (II) культивирования CD3-позитивных клеток, культивированных на этапе (I), в отсутствие агониста комплекса CD3/TCR и фибронектина или его варианта и в присутствии агониста CD30.

[3] Способ по [1] или [2], в котором CD3-позитивную клетку получают из плюрипотентной стволовой клетки.

[4] Способ по [3], в котором плюрипотентная стволовая клетка представляет собой iPS-клетку.

[5] Способ по любому из [1]-[4], в котором CD3-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор.

[6] Способ по любому из [1]-[5], в котором CD3-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную клетку.

[7] Способ по [6], в котором CD3-позитивная CD8-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку.

[8] Способ по любому из [1]-[7], в котором CD3-позитивная клетка является  $\gamma$ TCR-позитивной и/или  $\delta$ TCR-позитивной клеткой.

[9] Способ по любому из [1]-[8], в котором агонист комплекса CD3/TCR представляет собой агонист CD3 и/или агонист TCR.

[10] Способ по [9], в котором агонист CD3 представляет собой агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент.

[11] Способ по [10], в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент представляют собой агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент, полученные из клона UCST1.

[12] Способ по [9], в котором агонист TCR представляет собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из анти-TCR антитела или его связывающего фрагмента, комплекса HLA/пептид или его мультимера и комплекса HLA/суперантиген или его мультимера.

[13] Способ по [10] или [11], в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент иммобилизуют на культуральном контейнере.

[14] Способ по [13], в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент иммобилизуют путем приведения в контакт от 1 до 50000 нг/мл агонистического антитела к CD3 или его связывающего фрагмента с культуральным контейнером.

[15] Способ по любому из [1]-[14], в котором фибронектин или его вариант представляет собой

РетроНектин (RetroNectin) (зарегистрированный торговый знак).

[16] Способ по [15], в котором РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) иммобилизуют на культуральном контейнере.

[17] Способ по [16], в котором РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) иммобилизуют путем приведения в контакт от 1 до 150 мкг/мл РетроНектина (зарегистрированный торговый знак) с культуральным контейнером.

[18] Способ по любому из [1]-[17], в котором агонист CD30 представляет собой по меньшей мере одно, выбранное из группы, состоящей из агонистического антитела к CD30 или его связывающего фрагмента и лиганда CD30 или его связывающего фрагмента.

[19] Способ по [18], в котором агонистическое антитело к CD30 или его связывающий фрагмент содержится в среде.

[20] Способ по [19], в котором концентрация агонистического антитела к CD30 или его связывающего фрагмента в среде составляет от 1 до 1000 нг/мл.

[21] Способ по любому из [1]-[20], в котором среда включает по меньшей мере одно, выбранное из IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21.

[22] Способ по [21], в котором среда содержит IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21.

[23] Способ по [21] или [22], в котором среда дополнительно содержит TL1A и/или IL-12.

[24] Способ по любому из [1]-[23], в котором продуцируемая CD3-позитивная клетка также является CD197-позитивной.

[25] CD3-позитивная клетка, полученная способом по любому из [1]-[24].

[26] Способ экспансии в культуре CD3-позитивной клетки, включающий этап культивирования CD3-позитивной клетки в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта и агониста CD30.

[27] Набор для экспансии в культуре CD3-позитивной клетки, содержащий следующее:

(1) культуральный контейнер, на котором иммобилизованы агонист комплекса CD3/TCR и фибронектин или его вариант, и

(2) среду, содержащую агонист CD30.

[28] Способ поддержания CD3-позитивной клетки в виде CD3-позитивной CD197-позитивной клетки, включающий этап стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивной клетке.

[29] Способ по [28], в котором CD3-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную клетку.

[30] Способ по [29], в котором CD3-позитивная CD8-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную СО4-негативную клетку.

[31] Способ по любому из [28]-[30], в котором среда, используемая на этапе стимуляции, содержит по меньшей мере одно, выбранное из IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21.

[32] Способ по [31], в котором среда, используемая на этапе стимуляции, содержит IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21.

[33] Способ по [31] или [32], в котором среда, используемая на этапе стимуляции, дополнительно содержит TL1A и/или IL-12.

[34] Набор для поддержания CD3-позитивной клетки в виде CD3-позитивной CD197-позитивной клетки, содержащий агонист CD30.

[35] Химерный антигенный рецептор, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, причем внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный сигнальный домен CD30 или его мутант.

[36] Нуклеиновая кислота, содержащая полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по [35].

[37] Вектор экспрессии химерного антигенного рецептора, содержащий нуклеиновую кислоту по [36].

[38] Клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, содержащая вектор экспрессии химерного антигенного рецептора по [37].

[39] Клетка по [38], причем указанная клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, представляет собой CD3-позитивную клетку.

[40] Лекарственное средство, содержащее клетку по [38] или [39].

[41] Лекарственное средство по [40] для применения в профилактике или лечении опухоли, экспрессирующей антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по [35].

[42] Агент для уничтожения клетки, экспрессирующей антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по [35], причем указанный агент содержит клетку по [38] или [39].

[43] Клетка по [38] или [39] для применения в профилактике или лечении опухоли, экспрессирующей антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по [35].

[44] Применение клетки по [38] или [39] для получения агента для профилактики или лечения опухоли, экспрессирующей антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по [35].

[45] Способ профилактики или лечения опухоли, экспрессирующей антиген, распознаваемый хи-

мерным антигенным рецептором по [35], включающий введение клетки по [38] или [39].

#### **Преимущества, обеспечиваемые изобретением**

Т-клетки можно эффективно продуцировать или культивировать с целью их экспансии путем культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта и агониста CD30. Кроме того, поскольку CD3-позитивные клетки, продуцируемые или культивируемые с целью экспансии в указанной выше культуре, являются CD197-позитивными клетками, ожидается, что применение этих клеток обеспечит длительную эффективность терапии при использовании генетически модифицированных Т-клеток. Кроме того, CD3-позитивные клетки можно поддерживать в течение длительного времени в виде CD197-позитивных клеток путем стимуляции сигнала CD30 этих клеток.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 показаны концентрации, подходящие для иммобилизации агонистического антитела к CD3 и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), измеренные методом ELISA.

На фиг. 2 показано количество (измеренное по количеству АТФ) iPSC-производных Т-клеток через 12 дней после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 3 показаны кривые пролиферации iPSC-производных Т-клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или гранулами, покрытыми анти-CD3/CD28 антителами (анти-CD3/CD28 гранулами). По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 4 показаны кривые пролиферации iPSC-производных Т-клеток для каждого количества стимуляций иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 5 показана антигенспецифическая цитотоксическая активность iPSC-производных Т-клеток, пролиферирующих в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 6 показана пролиферация iPSC-производных Т-клеток, стимулированная иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) путем добавления агонистического антитела к CD30. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 7 показаны кривые пролиферации iPSC-производных Т-клеток, полученные в тесте на пролиферацию, причем iPSC-производные Т-клетки были стимулированы (первая стимуляция) иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30, за которой следовала такая же стимуляция (вторая стимуляция) после завершения теста. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой второй стимуляции.

На фиг. 8 показана экспрессия CD197 и CD45RA на поверхности клеточной мембраны iPSC-производных Т-клеток через 7 дней после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

На фиг. 9 показана антигенспецифическая цитотоксическая активность iPSC-производных Т-клеток, пролиферирующих при стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

На фиг. 10 показаны кривые пролиферации CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 11 показана экспрессия CD197 на поверхности клеточной мембраны CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, после стимуляции анти-CD3/CD28 гранулами, содержащими различные ИЛ и анти-CD30 антитело.

На фиг. 12 показано количество CD8-позитивных Т-клеток человека, выживших в крови, селезенке и костном мозге облученных мышей с иммунодефицитом через 4 недели после внутривенной трансплантации CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, после стимуляции анти-CD3/CD28 гранулами, содержащими различные ИЛ и анти-CD30 антитело.

На фиг. 13 показаны кривые пролиферации Т-клеток, происходящих из iPS-клеток (iPS-T), и анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток (анти-CD19 iPS-CART), стимулированных иммобили-

зованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 14 показаны кривые пролиферации анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 15 показана экспрессия CD197 на поверхности клеточной мембраны анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

На фиг. 16 показана направленная против CD19-экспрессирующих клеток Raji цитотоксическая активность анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) путем добавления агонистического антитела к CD30.

На фиг. 17 показана направленная против CD19-экспрессирующих клеток Raji цитотоксическая активность анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток (iCD19-CD30-CART), содержащих внутриклеточный домен, происходящий из CD30.

На фиг. 18 показана пролиферация клеток  $\gamma\delta T$  ( $i\gamma\delta T$ -клеток), дифференцированных из iPS-клеток, полученных из клеток, не относящихся к T-клеткам, и стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный товарный знак) путем добавления агонистического антитела к CD30. По вертикальной оси отложен коэффициент пролиферации клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 19 показана пролиферация анти-CD19-CAR $\gamma\delta T$  клеток (iCAR $\gamma\delta T$  клетки), стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) путем добавления агонистического антитела к CD30. По вертикальной оси отложено количество клеток, а по горизонтальной оси отложено количество дней, прошедших с момента инициации вышеупомянутой стимуляции.

На фиг. 20 показана антигенспецифическая цитотоксическая активность iCD19CAR/IL-15 $\gamma\delta T$  клеток, пролиферирующих при стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 21 показан эффект увеличения продолжительности жизни мышей, несущих опухоль, экспрессирующую CD19 человека, обеспечиваемый iCD19CAR/IL-15 $\gamma\delta T$  клетками, пролиферирующими в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 22 показан противоопухолевый эффект iCD19CAR/IL-15 $\alpha\beta T$  клеток, пролиферирующих в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

На фиг. 23 показана концентрация, подходящая для иммобилизации агонистического антитела к CD3 (UCHT1) и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), измеренная методом ELISA.

На фиг. 24 показана скорость пролиферации iPSC-производных T-клеток через 13 дней после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3 (UCHT1)/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

#### **Подробное описание изобретения**

В настоящем описании "экспрессия гена" включает как синтез мРНК из конкретной нуклеотидной последовательности гена (также называемый транскрипцией или экспрессией мРНК), так и синтез белка на основе информации, которую несет мРНК (также называемый трансляцией или экспрессией белка). Если не указано иное, "экспрессия гена" или просто "экспрессия" означает экспрессию белка.

В настоящем описании "позитивный" означает, что белок или мРНК экспрессируются в количестве, определяемом способом, известным в данной области. Белок может быть обнаружен с помощью иммунологического анализа с использованием антитела, такого как метод ELISA, метод иммуноокрашивания, вестерн-блоттинг и проточная цитометрия. Кроме того, вместе с белком осуществляется экспрессия репортерного белка, и целевой белок может быть обнаружен путем детектирования репортерного белка. Помимо этого, белок можно обнаружить путем детектирования функции белка (например, если белок является фактором транскрипции, детектируют ген, экспрессия которого контролируется этим белком, а в случае, когда белок является ферментом, детектируют субстрат или продукт, катализируемый белком, и т.п.). мРНК может быть обнаружена, например, с помощью метода амплификации нуклеиновой кисло-

ты и/или метода детектирования нуклеиновой кислоты, такого как ОТ-ПЦР, микроматрица, биочип, RNAseq (анализ транскриптом) и т.п.

В настоящем описании "негативный" означает, что уровень экспрессии белка или мРНК меньше нижнего предела детектирования любым из вышеупомянутых известных методов. Нижний предел детектирования экспрессии белка или мРНК может меняться в зависимости от метода.

В настоящем описании "культура" относится к поддержанию, пролиферации (росту) и/или дифференцировке клеток в среде *in vitro*. "Культивирование" означает поддержание, пролиферацию (рост) и/или дифференцировку клеток вне ткани или *ex vivo*, например, в чашке или колбе для культивирования клеток.

В настоящем описании "экспансия в культуре" означает культивирование с целью пролиферации требуемой популяции клеток и увеличения количества клеток. Увеличение количества клеток может быть достигнуто путем увеличения количества клеток в результате пролиферации настолько, чтобы это увеличение превышало уменьшение количества клеток в результате их гибели, и такое увеличение не требует пролиферации всех клеток в клеточной популяции. Увеличение количества клеток может представлять собой увеличение в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 300, 500, 1000, 3000, 5000, 10000, 100000 или не менее 1000000 раз по сравнению с количеством до начала экспансии в культуре.

В настоящем описании "стимуляция" означает, что определенное вещество связывается с различными рецепторами и т.п., активируя расположенный ниже сигнальный путь.

В настоящем описании "обогащать" относится к увеличению количества конкретного составляющего компонента в композиции, такой как композиция клеток и т.п., и "обогащенный" относится к популяции клеток, в которой при описании композиции клеток, например популяции клеток, количество конкретного составляющего компонента увеличено по сравнению с долей этого составляющего компонента в популяции клеток до обогащения. Например, композиция, такая как популяция клеток и т.п., может быть обогащена целевыми клетками, и, следовательно, доля целевых клеток увеличена по сравнению с долей целевых клеток в этой популяции клеток до обогащения.

Популяция клеток также может быть обогащена целевым типом клеток путем отбора клеток или с помощью метода скрининга, известного в данной области. Популяция клеток также может быть обогащена с помощью специального процесса отбора или скрининга, представленного в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98 или 99% популяции целевых клеток обогащают методом обогащения популяции целевых клеток.

В настоящем описании "популяция клеток" означает две или более клетки одного или разных типов. "Популяция клеток" также означает массу клеток одного и того же или разных типов.

Настоящее изобретение относится к способу продуцирования или способу экспансии в культуре CD3-позитивных клеток, включающему этап культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта и агониста CD30 (далее иногда упоминаемому как способ продуцирования или способ экспансии по настоящему изобретению).

Комплекс CD3/TCR и CD30 соответственно можно стимулировать агонистом комплекса CD3/TCR и агонистом CD30.

CD3-позитивная клетка, предназначенная для культивирования в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению, по существу не имеет ограничений при условии, что она экспрессирует CD3 на клеточной мембране. CD3-позитивная клетка предпочтительно представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную клетку (CD3-позитивную CD8-позитивную клетку или CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку), более предпочтительно CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку. Другой предпочтительной CD3-позитивной клеткой является, например, CD3-позитивная CD4-позитивная клетка (CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-позитивная клетка или CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-негативная клетка).

CD3-позитивная клетка, предназначенная для культивирования способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению, может быть CD30-позитивной до культивирования или может быть дифференцирована во время культивирования в CD30-позитивную клетку. Следовательно, когда CD3-позитивная клетка является CD30-позитивной до культивирования, CD3-позитивная клетка предпочтительно является CD3-позитивной CD8-позитивной CD30-позитивной клеткой (CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-позитивной CD30-позитивной клеткой или CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD30-позитивной клеткой), более предпочтительно CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD30-позитивной клеткой. Другой предпочтительной CD3-позитивной клеткой является, например, CD3-позитивная CD4-позитивная CD30-позитивная клетка (CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-позитивная CD30-позитивная клетка или CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-негативная CD30-позитивная клетка).

CD3-позитивная клетка, полученная путем продуцирования или экспансии в культуре способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению, не имеет особых ограничений при условии, что она экспрессирует CD3 на клеточной мембране и может быть, например,

клеткой, аналогичной CD3-позитивной клетке, культивируемой в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению. CD3-позитивная клетка после продуцирования или экспансии в культуре предпочтительно является CD197-позитивной. CD3-позитивная клетка после продуцирования или экспансии в культуре также является CD197-позитивной, эта клетка по существу является CD3-позитивной CD8-позитивной CD197-позитивной клеткой (CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-позитивной CD197-позитивной клеткой или CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD197-позитивной клеткой), более предпочтительно CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD197-позитивной клеткой. Альтернативно, клетка представляет собой CD3-позитивную CD4-позитивную CD30-позитивную CD197-позитивную клетку (CD3-позитивную CD4-позитивную CD8-позитивную CD30-позитивную CD197-позитивную клетку или CD3-позитивную CD4-позитивную CD8-негативную CD30-позитивную CD197-позитивную клетку). Среди CD3-позитивных клеток, поскольку CD197-позитивная клетка относится к стволовой Т-клетке памяти или Т-клетке центральной памяти в соответствии с наличием или отсутствием экспрессии CD45RA и имеет высокий потенциал самопролиферации, что позволяет обеспечить эффекторные Т-клетки, она является подходящей для формирования противоопухолевого иммунитета.

CD3-позитивная клетка после продуцирования или экспансии в культуре также предпочтительно является CD197-позитивной CD45RA-негативной. Когда CD3-позитивная клетка после продуцирования или экспансии в культуре также является CD197-позитивной CD45RA-негативной, эта клетка по существу является CD3-позитивной CD8-позитивной CD197-позитивной CD45RA-негативной клеткой (CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-позитивной CD197-позитивной CD45RA-негативной клеткой или CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD197-позитивной CD45RA-негативной клеткой), более предпочтительно CD3-позитивной CD8-позитивной CD4-негативной CD197-позитивной CD45RA-негативной клеткой. Альтернативно, клетка представляет собой CD3-позитивную CD4-позитивную CD30-позитивную CD197-позитивную CD45RA-негативную клетку (CD3-позитивную CD4-позитивную CD8-позитивную CD30-позитивную CD197-позитивную CD45RA-негативную клетку или CD3-позитивную CD4-позитивную CD8-негативную CD30-позитивную CD197-позитивную CD45RA-негативную клетку). Среди CD3-позитивных клеток CD197-позитивные CD45RA-негативные клетки по существу также называют Т-клеткой центральной памяти.

CD3 представляет собой молекулу, которая экспрессируется в процессе созревания Т-клеток, образует более крупный комплекс (комплекс CD3/TCR) с рецептором Т-клеток (TCR) и также известен как Т-клеточный маркер. Он представляет собой комплекс из четырех типов полипептидов с цепями  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  и  $\zeta$ . TCR, который образует комплекс с CD3, представляет собой молекулу, которая передает сигнал в Т-клетки, и примеры включают димер, состоящий из двух цепей из  $\alpha$ -цепи (TCR $\alpha$ ),  $\beta$ -цепи (TCR $\beta$ ),  $\gamma$ -цепи (TCR $\gamma$ ) и  $\delta$ -цепи (TCR $\delta$ ); гетеродимер ( $\alpha\beta$ TCR), состоящий из TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , гетеродимер ( $\gamma\delta$ TCR), состоящий из TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , и гомодимер, состоящий из одинаковых цепей TCR. Аналогично CD3, CD8 экспрессируется *in vivo* в процессе созревания Т-клеток и экспрессируется вместе с CD4 на ранних стадиях созревания, но только экспрессия CD4 теряется вместе с дифференцировкой в цитотоксические Т-клетки. CD8 представляет собой молекулу, которая функционирует как корецептор комплекса CD3/TCR и распознает пептид МНС класса I/антиген, и представляет собой гомодимер, состоящий из полипептидов  $\alpha$ -цепи, или гетеродимер, состоящий из двух типов полипептидов  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи. CD4 экспрессируется *in vivo* вместе с CD8 на ранних стадиях созревания Т-клеток, но только экспрессия CD8 теряется вместе с дифференцировкой в хелперные Т-клетки. Аналогично CD8, CD4 также функционирует как корецептор комплекса CD3/TCR, но в отличие от CD8 он представляет собой молекулу, которая распознает пептид МНС класса II/антиген. CD30 известен как молекула, экспрессируемая в активированных лимфоцитах (Т-клетках и В-клетках), имеет в качестве внеклеточных доменов шесть мотивов псевдоповторов, богатых цистеином, и в качестве внутриклеточного домена содержит последовательность, связывающую фактор, связанный с рецептором TNF (TRAF), которая стимулирует сигнал NF $\kappa$ B. CD197 и CD45RA используются в качестве маркерных молекул, позволяющих различить среди Т-клеток наивные Т-клетки, стволовые Т-клетки памяти (CD197-позитивные, CD45RA-позитивные), Т-клетки центральной памяти (CD197-позитивные, CD45RA-негативные), эффекторные Т-клетки памяти (CD197-негативные, CD45RA-негативные) и эффекторные Т-клетки (CD197-негативные, CD45RA-позитивные).

В способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению CD3-позитивные клетки, подлежащие культивированию, могут представлять собой клетки, полученные от млекопитающего, или клетки, полученные путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток. Предпочтительными являются клетки, полученные в результате дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

Когда CD3-позитивные клетки получают от млекопитающего, клетки можно выделять и собирать, например, путем забора мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) у млекопитающего с помощью афереза и затем использовать колонку с анти-CD3 антителами, метод центрифугирования в градиенте плотности и т.п.

Млекопитающие для сбора CD3-позитивных клеток включают людей и животных, отличных от человека (например, собак, кошек, мышей, крыс, хомяков, морских свинок, кроликов, свиней, коров, коз, лошадей, овец, обезьян и т.д.), человек является предпочтительным.

Когда CD3-позитивная клетка представляет собой клетку, полученную путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, плюрипотентные стволовые клетки включают эмбриональную стволовую клетку (ES-клетку), индуцированную плюрипотентную стволовую клетку (iPS-клетку), клетку эмбриональной карциномы (EC-клетку) и эмбриональную зародышевую клетку (EG-клетку). Предпочтительной является ES-клетка или iPS-клетка (более предпочтительной является человеческая iPS-клетка).

Когда плюрипотентная стволовая клетка представляет собой ES-клетку, ее можно получить известным способом. Примеры способа получения ES-клеток включают, без ограничения, способ культивирования внутренней клеточной массы на стадии бластоцисты млекопитающего (см., например, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)) и способ культивирования ранних эмбрионов, полученных путем переноса ядра соматических клеток (Wilmut et al., *Nature*, 385, 810 (1997); Cibelli et al., *Science*, 280, 1256 (1998); Akira Iriya et al., *Protein Nucleic Acid Enzyme*, 44, 892 (1999); Baguisi et al., *Nature Biotechnology*, 17, 456 (1999); Wakayama et al., *Nature*, 394, 369 (1998); Wakayama et al., *Nature Genetics*, 22, 127 (1999); Wakayama et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14984 (1999); Rideout III et al., *Nature Genetics*, 24, 109 (2000)) и т.п. ES-клетки могут быть получены из заранее определенного учреждения, а также могут быть приобретены в качестве коммерческого продукта. Например, линии человеческих ES-клеток H1, H7, H9, H13 и H14 доступны от научно-исследовательского института WiCell в США, линии человеческих ES-клеток HES1-6 доступны от ES Cell International в Австралии, линии человеческих ES-клеток SA002, SA181 и SA611 доступны от Cellartis AB в Швеции, линии человеческих ES-клеток HUES1-17 доступны от HUES Cell Facility в США, линии человеческих ES-клеток KhES-1 - KhES-5 доступны от института пограничной жизни и медицинских наук (Institute for Frontier Life and Medical Sciences) Киотского университета, и линии человеческих ES-клеток SEES1-SEES7 доступны от Национального центра здоровья и развития детей. Когда ES-клетку получают путем переноса ядра соматической клетки, тип соматических клеток и источник для сбора соматических клеток являются такими же, как и при получении iPS-клеток, описанных ниже.

Когда плюрипотентная стволовая клетка представляет собой iPS-клетку, iPS-клетка может быть получена путем введения в соматическую клетку вещества для репрограммирования ядра. Соматические клетки, которые можно использовать в качестве исходного материала для получения iPS-клеток, могут представлять собой любую клетку, кроме половых клеток, полученных от млекопитающих (например, мышцы или человека). Примеры включают ороговевшие эпителиальные клетки (например, ороговевшие эпидермальные клетки), эпителиальные клетки слизистой оболочки (например, эпителиальные клетки в поверхностном слое языка), эпителиальные клетки экзокринных желез (например, клетки молочных желез), клетки, секретирующие гормоны (например, клетки мозгового вещества надпочечников), метаболические/запасующие клетки (например, гепатоцит), клетки люминального эпителия, которые составляют поверхность раздела (например, альвеолярная клетка I типа), сосудистые клетки просвета эпителия (например, эндотелиальные клетки сосудов), реснитчатые клетки со способностью транспортировки (например, эпителиальные клетки дыхательных путей), клетки, секретирующие компоненты внеклеточного матрикса (например, фибробласты), сократительные клетки (например, гладкомышечные клетки), клетки крови и иммунной системы (например, Т-лимфоциты), клетки, относящиеся к сенсору (например, палочковидная клетка), нейроны вегетативной нервной системы (например, холинергический нейрон), клетки, поддерживающие периферические нейроны и сенсорные органы (например, сателлитная клетка), нервные клетки и глиальные клетки центральной нервной системы (например, астроглиальная клетка), пигментные клетки (например, клетка пигментного эпителия сетчатки) и их клетки-предшественники (клетка-предшественник ткани) и т.п. Степень клеточной дифференцировки не имеет особых ограничений, и в настоящем изобретении в качестве источника соматической клетки аналогичным образом можно использовать как недифференцированные клетки-предшественники (включая соматические стволовые клетки), так и окончательно дифференцированные зрелые клетки. В контексте настоящего описания примеры недифференцированных клеток-предшественников включают тканевые стволовые клетки (соматические стволовые клетки), такие как жировые стромальные (стволовые) клетки, нервные стволовые клетки, гемопозитические стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, стволовые клетки пульпы и т.п.

Вещество для репрограммирования ядра, которое предназначено для введения в соматические клетки для получения iPS-клеток, включает комбинации различных генов репрограммирования, известных на сегодняшний день из публикаций (см., например, WO 2007/069666, *Nature Biotechnology*, 26, 101-106 (2008), *Cell*, 126, 663-676 (2006), *Cell*, 131, 861-872 (2007), *Nat. Cell Biol.*, 11, 197-203 (2009), *Nature*, 451, 141-146 (2008), *Science*, 318, 1917-1920 (2007), *Stem Cells*, 26, 1998-2005 (2008), *Cell Research* (2008) 600-603, *Nature*, 454:646-650 (2008), *Cell Stem Cell*, 2:525-528 (2008), WO 2008/118820, *Nat. Cell Biol.*, 11, 197-203 (2009), *Nat. Cell Biol.*, 11, 197-203 (2009), *Science*, 324:797-801 (2009)). Кроме того, белок, кодируемый вышеупомянутым геном репрограммирования, также может быть введен в соматическую клетку в качестве вещества для репрограммирования ядра (*Cell Stem Cell*, 4:381-384 (2009), *Cell Stem Cell*, doi: 10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009)). С учетом того факта, что полученные iPS-клетки используются в

терапевтических целях, в частности, предпочтительна комбинация трех факторов Oct3/4, Sox2 и Klf4.

Колония iPSC-клеток может быть выбрана методом, в котором в качестве показателей используются устойчивость к лекарственным средствам и репортерная активность (Cell, 126, 663-676 (2006), Nature, 448, 313-317 (2007)), или методом, включающим визуальное морфологическое наблюдение (Cell, 131, 861-872 (2007)). Наличие iPSC-клеток может быть подтверждено с помощью экспрессии различных генов, специфичных для ES-клеток, и образования тератом в качестве показателей.

В настоящее время существуют различные типы iPSC-клеток (iPSC), и также могут быть использованы iPSC-клетки, созданные Yamanaka, et al. путем введения четырех факторов Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Мус в мышинные фибробласты (Takahashi K., Yamanaka S., Cell (2006), 126:663-676), iPSC, полученные из человеческой клетки, созданные путем введения аналогичных четырех факторов в фибробласты человека (Takahashi K., Yamanaka S., et al., Cell (2007), 131:861-872.), Nanog-iPSc, созданные путем отбора с помощью экспрессии Nanog в качестве индекса после введения вышеупомянутых четырех факторов (Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature, 448, 313-317), iPSC, полученные методом, не содержащим c-Мус (Nakagawa M., Yamanaka S., et al., Nature Biotechnology, (2008), 26, 101-106), и iPSC, созданные путем введения шести факторов безвирусным методом (Okita K. et al., Nat. Methods, 2011 May; 8(5):409-12, Okita K. et al., Stem Cells. 31(3):458-66.). Кроме того, также можно использовать iPSC, созданные Thomson et al. путем введения четырех факторов OCT3/4, SOX2, NANOG и LIN28 (Yu J., Thomson J.A. et al., Science (2007), 318:1917-1920.), iPSC, полученные Daley et al. (Park I.H., Daley G.Q. et al., Nature (2007), 451:141-146), индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные в патенте JP-A-2008-307007, и т.п.

Кроме того, могут быть использованы любые iPSC, известные в данной области, которые описаны в опубликованных статьях (например, Shi Y., Ding S. et al., Cell Stem Cell, (2008), Vol. 3, Issue 5, 568-574; Kim J.B., Scholer H.R., et al., Nature (2008), 454, 646-650; Huangfu D., Melton, D.A., et al., Nature Biotechnology (2008), 26, No.7, 795-797) или в патентах (например, JP-A-2008-307007, JP-A-2008-283972, US 2008-2336610, US 2009-047263, WO 2007/069666, WO 2008/118220, WO 2008/124133, WO 2008/151058, WO 2009/006930, WO 2009/006997, WO 2009/007852).

В качестве линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток можно использовать различные линии iPSC, созданные НИИ, RIKEN, Киотским университетом и т.п. Примеры линий человеческих iPSC включают штамм HiPS-RIKEN-1A, штамм HiPS-RIKEN-2A, штамм HiPS-RIKEN-12A, штамм Nips-B2 RIKEN, штамм 253G1, штамм 253G4, штамм 1201C1, штамм 1205D1, штамм 1210B2, штамм 1383D2, штамм 1383D6, штамм 201B7, штамм 409B2, штамм 454E2, штамм 606A1, штамм 610B1, штамм 648A1, штамм 1231A31, штамм Ffl-01s04 и т.п., при этом штамм 1231A3 является предпочтительным.

Когда CD3-позитивная клетка представляет собой клетку, полученную путем дифференцировки плюрипотентной стволовой клетки, TCR, экспрессируемый в CD3-позитивной клетке, включает димер, состоящий из двух из TCR $\alpha$ , TCR $\beta$ , TCR $\gamma$  и TCR $\delta$ , гетеродимер, состоящий из TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR), гетеродимер, состоящий из TCR $\gamma$  и TCR $\delta$  ( $\gamma\delta$ TCR), и гомодимер, состоящий из одинаковых цепей TCR. Хотя эти TCR могут быть эндогенными димерами или экзогенными димерами, предпочтительным является димер, содержащий экзогенный TCR $\alpha$  и экзогенный TCR $\beta$ .

В настоящем описании "экзогенный TCR" относится к гетеродимеру, состоящему из экзогенного TCR $\alpha$  и экзогенного TCR $\beta$ , гетеродимеру, состоящему из экзогенного TCR $\gamma$  и экзогенного TCR $\delta$ , и/или гомодимеру, состоящему из одной и той же экзогенной цепи TCR.

Когда TCR представляет собой димер, содержащий эндогенный TCR $\alpha$  и эндогенный TCR $\beta$ , плюрипотентная стволовая клетка может быть плюрипотентной стволовой клеткой, полученной из клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую эндогенный TCR $\alpha$ , и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую эндогенный TCR $\beta$ . Примеры таких клеток включают Т-клетки (CD8-позитивные CD4-негативные клетки, CD8-негативные CD4-позитивные клетки, CD4-позитивные CD8-позитивные клетки и т.п.). Когда TCR представляет собой димер, содержащий экзогенный TCR $\alpha$  и экзогенный TCR $\beta$ , плюрипотентная стволовая клетка может быть клеткой, содержащей нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\alpha$ , и нуклеиновую кислоту, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\beta$ .

В настоящем описании "экзогенная нуклеиновая кислота TCR" относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\alpha$ , нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\beta$ , нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\gamma$ , и/или нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\delta$ .

Способ введения экзогенной нуклеиновой кислоты TCR (например, нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\alpha$ , и нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую экзогенный TCR $\beta$ ) в плюрипотентную стволовую клетку не имеет особых ограничений. Например, можно использовать следующий метод.

Когда экзогенная нуклеиновая кислота TCR находится в форме ДНК, в плюрипотентные стволовые клетки могут быть введены, например, векторы, такие как вирус, плаزمиды, искусственная хромосома и т.п., такими методами, как липофекция, липосомный метод, микроинъекция и т.п. Примеры вирусного вектора включают ретровирусный вектор, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса, вектор на основе вируса Сендай и т.п. Примеры вектора на основе искусственной хромосомы включают искусственную хромосому человека (HAC), искусственную хромосому дрожжей (YAC), бактериальную искусственную хромосому (BAC, PAC) и т.п. В качестве плазмиды можно использовать плазмиду для клетки млекопитающего. Вектор может содержать контрольные последовательности, такие как промотор, энхансер, последовательность связывания рибосомы, терминатор, сайты полиаденилирования и т.п., для обеспечения возможности экспрессии экзогенного TCR. При необходимости, могут быть включены последовательности селективных маркеров, такие как ген устойчивости к лекарственным средствам (например, ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к пурамицину и т.п.), ген тимидинкиназы, ген токсина дифтерии и т.п., последовательности репортерных генов, такие как флуоресцентный белок,  $\beta$ -глюкуронидаза (GUS), FLAG и т.п., и т.п. Примеры промотора включают промотор SV40, промотор LTR, промотор CMV (цитомегаловируса), промотор RSV (вируса саркомы Рауса), LTR MoMuLV (вируса лейкемии мышей Молони), промотор HSV-TK (тимидинкиназы вируса простого герпеса), промотор EF- $\alpha$ , промотор CAG и промотор, чувствительный к лекарственным средствам. Примеры промотора, чувствительного к лекарственным средствам, включают промотор TRE (минимальный промотор CMV, имеющий последовательность, чувствительную к Tet, имеющую семь следующих друг за другом последовательностей tetO), который экспрессирует ген в присутствии соответствующего лекарственного средства. При использовании промотора TRE предпочтительно использовать режим, индуцирующий экспрессию гена путем одновременной экспрессии белка обратного tetR (rtetR), слитого с VP16AD, в одной и той же клетке в присутствии соответствующего лекарственного средства (например, тетрациклина или доксициклина). Кроме того, предпочтительным является вектор, имеющий промотор TRE и одновременно имеющий режим, при котором ген слитого белка rtetR-VP16AD экспрессируется в одном и том же векторе.

В настоящем изобретении для одновременной экспрессии экзогенного TCR $\alpha$  и экзогенного TCR $\beta$  также можно использовать режим полицистронной экспрессии. Для обеспечения полицистронной экспрессии последовательности, кодирующие гены, могут быть связаны с помощью кодирующей области IRES или вируса ящура (FMDV) 2A.

В другом варианте осуществления вышеупомянутый вектор может иметь последовательность транспозона, расположенную до и после этой экспрессионной кассеты (единицы экспрессии гена, содержащей промотор, последовательность гена и терминатор), что позволяет, при необходимости, вырезать последовательность, кодирующую экзогенный TCR, включенный в хромосому. Последовательность транспозона не имеет особых ограничений, и ее примером является *riggyBac*. В другом варианте осуществления для удаления экспрессионной кассеты до и после указанной экспрессионной кассеты может быть расположена последовательность loxP или последовательность FRT.

Когда экзогенная нуклеиновая кислота TCR находится в форме РНК, она может быть введена в плюрипотентные стволовые клетки таким способом, как электропорация, липофекция, микроинъекция и т.п.

В способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению CD3-позитивные клетки, подлежащие культивированию, также могут быть клетками, экспрессирующими химерный антигенный рецептор.

В настоящем изобретении "химерный антигенный рецептор (CAR)" означает слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен. Антигенсвязывающий домен CAR включает антигено с короткой цепью (scFv), в котором легкая цепь (VL) и тяжелая цепь (VH) вариабельной области антитела связаны в виде тандема через линкер (например, линкер GS). CD3-позитивные клетки, экспрессирующие CAR, распознают антиген в области scFv и затем трансдуцируют сигнал распознавания в Т-клетки через внутриклеточный сигнальный домен. Введение CAR в CD3-позитивные клетки позволяет придать специфичность представляющему интерес антигену. Кроме того, поскольку CAR может непосредственно распознавать молекулы антигена вне зависимости от того, принадлежит ли он к HLA класса I или класса II, также может быть индуцирован сильный иммунный ответ против клеток со сниженной экспрессией гена HLA класса I или класса II.

Примеры антигена, на который нацелены упомянутые выше TCR и CAR, включают, без ограничения, опухолевые антигены. Опухолевый антиген может быть опухолеспецифическим антигеном (TSA) или ассоциированным с опухолью антигеном (TAA). Конкретные примеры такого опухолевого антигена включают один или более видов антигенов, выбранных из группы, состоящей из дифференцированных антигенов, таких как MART-1/MelanA (MART-1), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и т.п., опухолеспецифические поливалентные антигены, такие как WT1, глипикан-3, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15 и т.п., фетальные антигены, такие как CEA и т.п., сверхэкспрессируемые опухолевые гены или мутировавшие опухоль-подавляющие гены, такие как p53, Ras, HER-2/neu и т.п., уни-

кальные опухолевые антигены, вызванные транслокацией хромосом, такие как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR и т.п., и вирусные антигены, такие как антиген вируса Эпштейна-Барра EBVA, антигены E6 и E7 вируса папилломы человека (HPV) и т.п. В качестве других опухолевых антигенов следует упомянуть CD19, CD20, EGP2, erB2,3,4, GD2, GD3, мезотелин, PSMA, 8H9, Lewis-Y, MUC1, TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17.1, NuMa, K-ras,  $\beta$ -катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72,  $\alpha$ -фетопротеин,  $\beta$ -HCG, BCA225, BTAA, CA 125, CA 15-3/CA 27.29/BCAA, CA 195, CA 242, CA-50, CAM43, CD68/P1, CO-029, FGF-5, G250, Ga733/EpCAM, HTgp-175, M344, MA-50, MG7-Ag, MOV18, NB/70K, NY-CO-1, RCAS1, SDCCAG16, TA-90/Mac-2-связывающий белок/циклофилин С-ассоциированный белок, TAAL6, TAG72, TLP и TPS.

Примеры трансмембранного домена CAR включают трансмембранный домен, полученный из белка, выбранного из группы, состоящей из  $\alpha$ -цепи,  $\beta$ -цепи или  $\zeta$ -цепи TCR, CD28, CD3 $\epsilon$ -цепь, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, 4-1BB (CD137) и CD154 и т.п. Среди них предпочтительным является трансмембранный домен, полученный из CD8. Кроме того, например, также предпочтительно использовать трансмембранный домен, полученный из молекулы, из которой происходит первый внутриклеточный сигнальный домен, связанный с антигенсвязывающим доменом. Когда, например, молекула, из которой происходит первый внутриклеточный сигнальный домен, связанный с антигенсвязывающим доменом, представляет собой CD28, трансмембранный домен также может происходить из CD28. В качестве альтернативы также можно использовать искусственно созданный трансмембранный домен.

Примеры внутриклеточного сигнального домена CAR включают, без ограничения, внутриклеточные домены, происходящие из одного или более видов белков, выбранных из группы, состоящей из FcR $\gamma$ -цепи, FcR $\beta$ -цепи, CD3 $\gamma$ -цепи, CD3 $\delta$ -цепи, CD3 $\epsilon$ -цепи, CD3 $\zeta$ -цепи, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Среди них предпочтительным является внутриклеточный домен, полученный из CD3 $\zeta$ -цепи. При запуске фосфорилирования тирозина с помощью ITAM, содержащимся во внутриклеточном домене CD3 $\zeta$ -цепи, происходит ряд реакций, таких как увеличение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup>, секреция цитокинов и т.п., и, наконец, происходит деление клеток, и CD3-позитивные клетки демонстрируют цитотоксическую активность как CTL. Внутриклеточный сигнальный домен дополнительно может содержать внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Примеры костимулирующей молекулы включают, без ограничения, внутриклеточные домены одного или более видов белков, выбранных из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, антигена-1, ассоциированного с функцией лимфоцитов (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и CD83. Среди них предпочтительными являются внутриклеточные домены, происходящие от CD28, 4-1BB (CD137), CD30. Связывание CD28 может способствовать пролиферации Т-клеток за счет увеличения продуцирования IL-2. Кроме того, 4-1BB может способствовать дифференцировке в клетки памяти путем подавления апоптоза, вызванного на последнем этапе активации Т-клеток. CD30 может дополнительно улучшать пролиферацию CD3-позитивных клеток при использовании анти-CD3 антитела и позволяет поддерживать клетки как CD197-позитивные клетки в течение длительного времени. Путем выбора типа и количества костимулирующей молекулы можно контролировать силу и продолжительность активности CAR (например, Mol. Ther. 2009; 17:1453-1464). Когда внутриклеточный сигнальный домен содержит один или более видов внутриклеточных доменов, их порядок не ограничен.

Между антигенсвязывающим доменом CAR и трансмембранным доменом или между внутриклеточным сигнальным доменом CAR и трансмембранным доменом может быть вставлен спейсер. В качестве спейсера обычно можно использовать пептид, состоящий не более чем из 300 аминокислот, предпочтительно от 10 до 100 аминокислот и наиболее предпочтительно от 25 до 50 аминокислот. Его конкретные примеры включают, без ограничения, шарнирную область, полученную из IgG1, пептид, содержащий область CH2CH3 иммуноглобулина и часть CD3, и т.п.

Конкретные примеры CAR включают, без ограничения, CAR первого поколения, в котором scFv и CD3 $\zeta$ -цепь связаны через спейсер, CAR второго поколения, в котором между scFv CAR первого поколения и CD3 $\zeta$ -цепь включены трансмембранный домен и внутриклеточный домен, полученный из CD28, для усиления способности активации Т-клеток, и CAR третьего поколения, в котором между внутриклеточным доменом CD28 CAR второго поколения и CD3 $\zeta$ -цепь включен внутриклеточный домен костимулирующей молекулы (4-1BB или OX40), отличной от CD28.

В способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению CD3-позитивная клетка, предназначенная для культивирования, также может представлять собой клетки, коэкспрессирующие CAR и слитый белок IL-15 и IL-15R $\alpha$  (IL-15/IL-15R $\alpha$ ). CAR, экспрессируемый с IL-15/IL-15R $\alpha$ , может быть аналогичным вышеупомянутому CAR.

В настоящем изобретении "IL-15/IL-15R $\alpha$ " означает слитый белок, содержащий IL-15 и IL-15R $\alpha$ . В системе передачи сигнала IL-15 IL-15R $\alpha$ , экспрессируемый на антигенпрезентирующих клетках, обычно связывается с IL-15, и IL-15 презентуется рецептору IL-15, состоящему из общей  $\gamma$ -цепи ( $\gamma$ c) с IL-15R $\beta$ , на CD8-позитивных и CD4-негативных клетках (транс-презентация), благодаря чему сохраняется

цитотоксическая активность CD8-позитивных CD4-негативных клеток. Следовательно, когда CD3-позитивная клетка, экспрессирующая IL-15/IL-15R $\alpha$ , является CD8-позитивной CD4-негативной, такая клетка может передавать сама себе сигнал IL-15 через рецептор IL-15. Альтернативно, CD3-позитивная клетка, экспрессирующая IL-15/IL-15R $\alpha$ , может передавать сигнал IL-15 другим CD8-позитивным CD4-негативным клеткам через рецептор IL-15. Как описано выше, поскольку IL-15/IL-15R $\alpha$  может поддерживать цитотоксическую активность CD8-позитивной CD4-негативной клетки, ожидается, что она будет демонстрировать постоянное цитотоксическое воздействие на клетки, на которые нацелен CAR.

IL-15/IL-15R $\alpha$  может быть белком трансмембранного типа или секреторным белком. Известно, что в IL-15R $\alpha$  IL-15-связывающий домен, состоящий из 1-65 аминокислот от N-конца зрелого белка, является областью, ответственной за связывание IL-15 (Wei X. et al., J. Immunol., 167:277-282, 2001). Следовательно, белок трансмембранного типа может быть белком с сохраненным IL-15-связывающим доменом и сохраненным трансмембранным доменом IL-15R $\alpha$ . С другой стороны, секреторный белок может быть белком, у которого сохранен IL-15-связывающий домен, но отсутствует трансмембранный домен IL-15R $\alpha$ .

Между IL-15 и IL-15R $\alpha$  в IL-15/IL-15R $\alpha$  может быть включен спейсер. В качестве спейсера можно использовать пептид, обычно состоящий не более чем из 300 аминокислот, предпочтительно из 10-100 аминокислот, наиболее предпочтительно из 20-50 аминокислот. Конкретные примеры спейсера включают, без ограничения, линкер GS и т.п.

IL-15/IL-15R $\alpha$  не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой пептид, в котором IL-15 и IL-15R $\alpha$  связаны через спейсер, и конкретные примеры этого пептида включают пептид, состоящий из SEQ ID NO: 8. Учитывая то, что IL-15/IL-15R не имеет особых ограничений при условии, что он может связываться с рецептором IL-15 и передавать сигнал IL-15 в клетку, можно упомянуть, например, пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не менее примерно 90%, предпочтительно не менее примерно 95%, более предпочтительно не менее примерно 97%, особенно предпочтительно не менее примерно 98%, наиболее предпочтительно не менее примерно 99%, с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 8. Используемый в настоящем описании термин "гомология" означает отношение (%) одной и той же аминокислоты и аналогичного аминокислотного остатка ко всем перекрывающимся аминокислотным остаткам при оптимальном выравнивании, при котором две аминокислотные последовательности выровнены с помощью математического алгоритма, известного в соответствующей технической области техники (предпочтительно, алгоритм является таким, который позволяет ввести пробел (зазор) в одну или обе последовательности для оптимального выравнивания). "Аналогичная аминокислота" означает аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами и, например, аминокислоты, отнесенные к одной и той же группе, такие как ароматические аминокислоты (Phe, Trp, Tyr), алифатические аминокислоты (Ala, Leu, Ile, Val), полярные аминокислоты (Gln, Asn), основные аминокислоты (Lys, Arg, His), кислые аминокислоты (Glu, Asp), аминокислоты с гидроксильной группой (Ser, Thr), аминокислоты с небольшой боковой цепью (Gly, Ala, Ser, Thr, Met) и т.п. Предполагается, что при замене такими аналогичными аминокислотами фенотип белка не изменится (т.е. консервативная аминокислотная замена). Конкретные примеры консервативной аминокислотной замены хорошо известны в данной области техники и описаны в различных документах (например, Bowie et al., Science, 247:1306-1310 (1990)). Гомология аминокислотной последовательности в настоящем описании может быть вычислена с помощью алгоритма вычисления гомологии NCBI BLAST (Базовый инструмент поиска местного выравнивания Национального центра биотехнологической информации) и при следующих условиях (ожидание = 10; допустимый пробел; матрица = BLOSUM62; фильтрация = ВЫКЛ).

Когда химерный антигенный рецептор и/или IL-15/IL-15R $\alpha$  экспрессируется в CD3-позитивных клетках, культивируемых способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению, способ введения нуклеиновой кислоты CAR и/или нуклеиновой кислоты IL-15/IL-15R $\alpha$  в клетки (например, плюрипотентные стволовые клетки) не имеет особых ограничений, и, например, можно использовать способ, такой же, как способ введения нуклеиновой кислоты TCR.

Когда CD3-позитивная клетка, подлежащая культивированию в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению, представляет собой клетку, полученную путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток, плюрипотентные стволовые клетки можно дифференцировать в CD3-позитивные клетки известным способом. Конкретные способы дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в CD3-позитивные клетки описаны, например, в WO 2016/076415 и WO 2017/221975. Конкретный способ дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в CD3-позитивные клетки может включать, например, (1) способ дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники и (2) способ дифференцировки гемопоэтических клеток-предшественников в CD3-позитивные клетки.

(1) Способ дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники.

На этапе (1) гемопоэтическая клетка-предшественник (HPC) означает CD34-позитивную клетку, предпочтительно CD34-позитивную CD43-позитивную (DP) клетку. На этапе (1) гемопоэтические клетки-предшественники и гемопоэтические стволовые клетки не различаются и относятся к одной и той же клетке, если не указано иное.

Способ дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники не имеет особых ограничений при условии, что он может вызывать дифференцировку в гемопоэтические клетки-предшественники. Примеры включают способ, включающий культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде для индукции гемопоэтических клеток-предшественников, описанный, например, в WO 2013/075222, WO 2016/076415 и Liu S. et al., *Cytotherapy*, 17 (2015); 344-358 и т.п.

На этапе (1) среда, используемая для индукции в гемопоэтические клетки-предшественники, не имеет особых ограничений. Среда, используемая для культивирования клеток животных, можно приготовить на основе минимальной среды. Примеры минимальной среды включают, без ограничения, среду Дульбекко (например, LMDM), среду Игла (например, DMEM, EMEM, BME, MEM,  $\alpha$ MEM), среду Хэма (например, среду F10, среду F12), среду RPMI (например, среду RPMI-1640, среду RPMI-1630), среду MCDB (например, среду MCDB104, 107, 131, 151, 153), среду Фишера, среду 199, культуральную среду для ES-клеток приматов (культуральную среду для ES/iPS клеток приматов, Reprocell), среду для мышечных ES клеток (культуральную среду TX-WES, Thromb-X), бессывороточную среду (mTeSR, Stemcell Technologies), ReproFF, StemSpan (зарегистрированный торговый знак) SFEM, StemSpan (зарегистрированный торговый знак) H3000, StemlineII, среду ESF-B, среду ESF-C, среду CSTI-7, Neurobasal среду (Life Technologies, Inc.), среду StemPro-34, StemFit (зарегистрированный торговый знак) (например, StemFit AK03N, StemFit AK02N) и т.п. Кроме того, эти среды можно при необходимости смешивать и использовать, и, например, можно упомянуть среду DMEM/F12 и т.п. Используемая минимальная среда может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. Минимальная среда может быть соответствующим образом дополнена 10-20% сывороткой (фетальной бычьей сывороткой (FBS), человеческой сывороткой, лошадиной сывороткой) или заменителем сыворотки (KSR и т.п.), инсулином, различными витаминами, L-глутамином, различными аминокислотами, такими как заменимые аминокислоты и т.п., 2-меркаптоэтанолом, различными цитокинами (интерлейкинами (IL-2, IL-7, IL-15 и т.д.), SCF (фактором стволовых клеток), активином и т.п.), различными гормонами, различными факторами роста (фактором ингибирования лейкемии (LIF), основным фактором роста фибробластов (bFGF), TGF $\beta$  и т.д.), различными внеклеточными матриксами, различными молекулами клеточной адгезии, антибиотиками, такими как пенициллин/стрептомицин, пурамицин и т.п., индикатором pH, таким как феноловый красный и т.п., и т.п. При необходимости минимальная среда также может содержать витамин C (например, аскорбиновую кислоту), альбумин, инсулин, трансферрин, соединение селена (например, селенит натрия), жирную кислоту, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиоглицерин (например,  $\alpha$ -монотиоглицерин (MTG)), липиды, L-аланил-L-глутамин (например, Глутамакс (зарегистрированный торговый знак)), факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики, антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли и т.п.

На этапе (1) "витамин C" означает L-аскорбиновую кислоту и ее производные, и "производное L-аскорбиновой кислоты" означает производные, которые превращаются в витамин C в результате ферментативной реакции в живом организме. Примеры производных L-аскорбиновой кислоты, используемых на этапе (1), включают фосфат витамина C, глюкозид аскорбиновой кислоты, аскорбилэтил, сложный эфир витамина C, аскорбилтетрагексилдеканат, аскорбилстеарат и аскорбил-2-фосфат-6-пальмитат. Предпочтительным является фосфат витамина C. Примеры фосфата витамина C (например, 2-фосфата аскорбиновой кислоты) включают соли фосфата L-аскорбиновой кислоты, такие как фосфат Na L-аскорбиновой кислоты и фосфат Mg L-аскорбиновой кислоты.

Когда используется витамин C, витамин C предпочтительно добавляют (обеспечивают) каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день. Витамин C более предпочтительно добавлять каждый день. В одном из вариантов осуществления витамин C предпочтительно добавляют в среду в количестве, соответствующем от 5 до 500 нг/мл (например, количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 нг/мл). В другом варианте осуществления витамин C добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5-500 мкг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл).

В среду, используемую на этапе (1), можно дополнительно добавить по меньшей мере один вид цитокина, выбранного из группы, состоящей из BMP4 (костного морфогенетического белка 4), VEGF (фактора роста эндотелия сосудов), SCF (фактора стволовых клеток), TPO (тромбопоэтина), FLT-3L (лиганда Flt3) и bFGF (основного фактора роста фибробластов). Более предпочтительной является культура, дополненная BMP4, VEGF и bFGF, и еще более предпочтительной является культура, дополненная BMP4, VEGF, SCF и bFGF.

Когда используется цитокин, его концентрация в среде может составлять, например, 5-500 нг/мл для BMP4, 5-500 нг/мл для VEGF, 5-500 нг/мл для SCF, 3-300 нг/мл для TPO, 1-100 нг/мл для FLT-3L и

5-500 нг/мл для bFGF.

В среду можно добавить ингибитор TGF $\beta$ . Ингибитор TGF $\beta$  представляет собой низкомолекулярный ингибитор, который препятствует передаче сигнала семейства TGF $\beta$  и включает, например, SB431542, SB202190 (оба: R.K. Lindemann et al., *Mol. Cancer*, 2:20 (2003)), SB505124 (GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208 (Scios), LY2109761, LY364947, LY580276 (Lilly Research Laboratories) и т.п. Например, когда ингибитор TGF $\beta$  представляет собой SB431542, его концентрация в среде предпочтительно составляет 0,5-100 мкМ.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в адгезивной культуре или суспензионной культуре. В случае адгезивной культуры культивирование можно осуществлять в культуральном сосуде, покрытом компонентом внеклеточного матрикса, и/или можно культивировать совместно с фидерными клетками. С учетом того факта, что фидерная клетка не имеет особых ограничений, можно упомянуть, например, фибробласт (фибробласт эмбриона мыши (MEF), фибробласт мыши (STO) и т.п.). Фидерные клетки предпочтительно инактивировать известным способом, например облучением (гамма-излучением и т.п.), обработкой противораковым агентом (митомицином С и т.п.) и т.п. В качестве компонента внеклеточного матрикса можно упомянуть волокнистые белки, такие как матригель (Niwa A., et al., *PLoS One*. 6(7):e22261, 2011), желатин, коллаген, эластин и т.п., глюкозаминогликан и протеогликан, например гиалуроновую кислоту, хондроитин сульфат и т.п., белки клеточной адгезии, такие как фибронектин, витронектин, ламинин и т.п., и т.п.

Суспензионная культура означает культивирование клеток в условиях отсутствия адгезии к культуральному контейнеру и не имеет особых ограничений. Для улучшения адгезивной способности по отношению к клеткам можно использовать культуральный контейнер, не подвергнутый искусственной обработке (например, не покрытый внеклеточным матриксом и т.п.), или культуральный контейнер, подвергнутый обработке для искусственного подавления адгезии (например, обработке путем покрытия полигидроксиэтилметакриловой кислотой (поли-ГЭМА) или неионогенным поверхностно-активным полиолом (Плюрониом F-127 и т.д.)). В суспензионной культуре предпочтительно формируют и культивируют эмбрионид (EB).

Гемопозитические клетки-предшественники также могут быть получены из sac-подобной структуры (также называемой ES-sac или iPS-sac), полученной путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток. В контексте настоящего описания "sac-подобная структура" представляет собой полученную из плюрипотентных стволовых клеток трехмерную мешкообразную (с пространствами внутри) структуру, которая образована популяцией эндотелиальных клеток и т.п., внутри которой содержатся гемопозитические клетки-предшественники.

Температурные условия на этапе (1) не имеют особых ограничений. Температура находится в пределах, например, от примерно 37 до примерно 42°C, предпочтительно от примерно 37 до примерно 39°C. Период культивирования может быть соответствующим образом определен специалистами в данной области путем мониторинга количества гемопозитических клеток-предшественников и/или т.п. Количество дней культивирования не ограничено при условии возможности получения гемопозитических клеток-предшественников. Примеры периода культивирования включают по меньшей мере 6 дней, по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 8 дней, по меньшей мере 9 дней, по меньшей мере 10 дней, по меньшей мере 11 дней, по меньшей мере 12 дней, по меньшей мере 13 дней и по меньшей мере 14 дней. Период культивирования предпочтительно составляет 14 дней. Хотя более длительный период культивирования, как правило, не вызывает проблем при продуцировании гемопозитических клеток-предшественников, предпочтительно он составляет не более 35 дней, более предпочтительно не более 21 дня. Культивирование можно осуществлять в условиях с низким содержанием кислорода, и условия с низким содержанием кислорода в настоящем описании означают, например, концентрацию кислорода 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5% или ниже.

(2) Этап дифференцировки гемопозитических клеток-предшественников в CD3-позитивные клетки.

Способ дифференцировки гемопозитических клеток-предшественников в CD3-позитивные клетки не имеет особых ограничений при условии, что он позволяет дифференцировать гемопозитические клетки-предшественники в CD3-позитивные клетки. Примеры включают способ культивирования гемопозитических клеток-предшественников в тех же условиях культивирования, что и в способе индукции Т-клеток из гемопозитических клеток-предшественников, описанный в WO 2016/076415, WO 2017/221975 и т.п.

На этапе (2) среда для индуцирования дифференцировки в CD3-позитивные Т-клетки не имеет особых ограничений, и среда, используемая для культивирования животных клеток, может быть приготовлена на основе минимальной среды. Примеры минимальной среды включают среды, которые аналогичны минимальной среде, использованной на вышеупомянутом этапе (1). Среда может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. При необходимости минимальная среда также может содержать витамин С (например, аскорбиновую кислоту), альбумин, инсулин, трансферрин, соединение селена (например, селенит натрия), жирную кислоту, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиоглицерин (например,  $\alpha$ -монотиоглицерин), (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Глютамакс (зарегистрированный торговый знак)), заменимые аминокислоты, витамины, факторы роста,

низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины и т.п.

Когда на этапе (2) используется витамин С, витамин С может быть таким же, как описанный на этапе (2-1), и может быть добавлен аналогичным образом. В одном из вариантов осуществления концентрация витамина С в среде или культуральной среде предпочтительно составляет 5-200 мкг/мл. В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5-500 мкг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл).

На этапе (2) предпочтительными являются ингибитор р38 и/или SDF-1 (фактор 1, происходящий из стромальных клеток). В настоящем описании "ингибитор р38" означает вещество, которое ингибирует функции белка р38 (киназы р38 MAP). Его примеры включают, без ограничения, химический ингибитор р38, доминантно негативный мутант р38 или кодирующую их нуклеиновую кислоту и т.п.

Примеры химического ингибитора р38, используемого на этапе (2), включают, без ограничения, SB203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфонилфенил)-5-(4-пиридил)-1Н-имидазол) и его производные, SB202190 (4-(4-фторфенил)-2-(4-гидроксифенил)-5-(4-пиридил)-1Н-имидазол) и его производные, SB239063 (транс-4-[4-(4-фторфенил)-5-(2-метокси-4-пиримидинил)-1Н-имидазол-1-ил]циклогексанол) и его производные, SB220025 и его производные, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SCIO-469, SCIO-323, VX-702 и FR167653. Эти соединения являются коммерчески доступными, и, например, SB203580, SB202190, SB239063, SB220025 и PD169316 доступны от Calbiochem, и SCIO-469 и SCIO-323 доступны от Scios и т.п. Химический ингибитор р38 предпочтительно представляет собой SB203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфонилфенил)-5-(4-пиридил)-1Н-имидазол) или его производные.

Примеры доминантно негативного мутанта р38 на этапе (2) включают р38T180A, полученный точечной мутацией треонина в положении 180, расположенного в ДНК-связывающей области р38, на аланин, р38Y182F, полученный точечной мутацией тирозина в положении 182 р38 у человека и мыши на фенилаланин и т.п. Ингибитор р38 содержится в среде в концентрации, например, от примерно 1 до примерно 50 мкМ. Когда в качестве ингибитора р38 используется SB203580, он может содержаться в среде в концентрациях от 1 до 50 мкМ, от 5 до 30 мкМ, от 10 до 20 мкМ.

SDF-1 на этапе (2) может представлять собой не только SDF-1 $\alpha$  или его зрелую форму, но также изоформу, такую как SDF-1 $\beta$ , SDF-1 $\gamma$ , SDF-1 $\delta$ , SDF-1 $\epsilon$ , SDF-1 $\phi$  и т.п., или их зрелую форму, или их смесь в любом соотношении или т.п. Предпочтительно использовать SDF-1 $\alpha$ . SDF-1 иногда упоминается как CXCL-12 или PBSF.

На этапе (2) одна или более аминокислот в аминокислотной последовательности SDF-1 могут быть заменены, удалены, добавлены и/или вставлены при условии, что аминокислотная последовательность SDF-1 имеет активность хемокина (SDF-1 с такой заменой, делецией, добавлением и/или вставкой аминокислоты также упоминается как "мутант SDF-1"). Аналогично, в SDF-1 или мутант SDF-1 может быть заменена, удалена и/или добавлена сахарная цепь. Примеры мутанта вышеупомянутого SDF-1 включают мутанты, у которых сохранились по меньшей мере четыре остатка цистеина (Cys30, Cys32, Cys55 и Cys71 в человеческом SDF-1 $\alpha$ ) и которые имеют не менее 90% идентичности с аминокислотной последовательностью природного вещества, хотя мутация аминокислот этим не ограничена. SDF-1 может быть получен от млекопитающего, например человека, или млекопитающего, не относящегося к человеку, такого как обезьяна, овца, крупный рогатый скот, лошадь, свинья, собака, кошка, кролик, крыса, мышь и т.п. Например, белок, зарегистрированный под номером доступа GenBank: NP\_954637, можно использовать как человеческий SDF-1 $\alpha$ , и белок, зарегистрированный под номером доступа GenBank: NP000600, можно использовать как SDF-1 $\beta$ .

SDF-1 может быть коммерчески доступным, очищенным природным SDF-1 или полученным способами пептидного синтеза или генной инженерии. SDF-1 содержится в среде в диапазоне, например, от примерно 10 до примерно 100 нг/мл. Кроме того, вместо SDF-1 можно использовать альтернативный SDF-1, имеющий активность, аналогичную таковой у SDF-1. Примеры такого альтернативного SDF-1 включают агонист CXCR4, и вместо SDF-1 в среду может быть добавлено низкомолекулярное соединение, обладающее активностью агониста CXCR4 и т.п.

В культуральную среду, используемую на этапе (2), можно дополнительно добавить по меньшей мере один вид, предпочтительно все, цитокина, выбранного из группы, состоящей из SCF, TPO (тромбопоэтина), FLT-3L и IL-7. Их концентрация составляет, например, от 10 до 100 нг/мл для SCF, от 10 до 200 нг/мл для TPO, от 1 до 100 нг/мл для IL-7 и от 1 до 100 нг/мл для FLT-3L.

На этапе (2) гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать в адгезивной культуре или суспензионной культуре. В случае адгезивной культуры можно использовать культуральный сосуд с покрытием и/или гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать совместно с фидерными клетками и/или т.п. Примеры фидерных клеток для совместной культуры включают линию стромальных клеток костного мозга, клетки OP9 (доступные от Riken BioResource Center). Клетка OP9 предпочтительно представляет собой клетку OP9-DL4 или клетку OP9-DL1, которая постоянно экспрессирует DLL4 или DLL1 (например, Holmes R.I and Zuniga-Pflucker J.C. Cold Spring Harb Protoc. 2009 (2)). На этапе (2) в случаях, когда в качестве фидерных клеток используют клетки OP9, для получения совме-

стной культуры в среду может быть добавлен DLL1 или отдельно приготовленный DLL4 или DLL1, или белок DLL4 или DLL1, слитый с Fc, или т.п. Когда используются фидерные клетки, в процессе культивирования предпочтительно производят замену фидерных клеток соответствующим образом. Замену фидерных клеток можно осуществлять путем переноса культивированных клеток субъекта на фидерные клетки, предварительно выращенные в чашках. Замену можно осуществлять каждые пять дней, каждые четыре дня, каждые три дня или каждые два дня. Когда гемопоэтические клетки-предшественники выращивают в виде эмбриоида в суспензионной культуре, после диссоциации на отдельные клетки предпочтительно получать адгезивную культуру. Хотя клетки можно культивировать совместно с фидерными клетками, культивирование предпочтительно выполнять без использования фидерных клеток.

В случае адгезивной культуры и в случае использования культурального контейнера с покрытием примеры покрывающего агента включают матригель (Niwa A., et al., PLoS One, 6(7):e22261, 2011), коллаген, желатин, ламинин, гепарансульфат протеогликан, РетроНектин, белок DLL4 или DLL1 или DLL4 или DLL1, слитый с Fc-областью антитела (далее иногда называемой Fc) и т.п. (например, химеру DLL4/Fc), энтактин и/или их комбинацию, при этом предпочтительной является комбинация РетроНектина с белком DLL4, слитым с Fc и т.д.

На этапе (2) температурные условия культивирования не ограничены. Температура находится в пределах, например, от примерно 37 до примерно 42°C, предпочтительно от примерно 37 до примерно 39°C. Период культивирования может быть определен надлежащим образом специалистами в данной области путем мониторинга количества CD3-позитивных клеток и т.п. Количество дней культивирования не ограничено при условии, что могут быть получены CD3-позитивные клетки. Примеры периода культивирования включают не менее 10 дней, не менее 12 дней, не менее 14 дней, не менее 16 дней, не менее 18 дней, не менее 20 дней, не менее 22 дней и не менее 23 дней. Период культивирования предпочтительно составляет 21 день. Кроме того, предпочтительным является период не более 90 дней и более предпочтительным является период не более 42 дней.

Клетки, полученные на вышеуказанных этапах, включают CD3-позитивные клетки. Конкретный метод дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в CD3-позитивные клетки может дополнительно включать следующий этап (3).

(3) Этап получения CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных клеток (или CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных CD30-позитивных клеток) или этап обогащения CD3-позитивными клетками.

Примеры способа получения CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных клеток (или CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных CD30-позитивных клеток) включают способы, описанные в WO 2016/076415, WO 2017/221975 и т.п. Обогащение CD3-позитивными клетками также может быть выполнено аналогичным способом.

На этапе (3) среда, используемая для получения CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных клеток (или CD3-позитивных CD8-позитивных CD4-негативных CD30-позитивных клеток) или обогащения CD3-позитивными клетками, не имеет особых ограничений, при этом среда, используемая для культивирования клеток животных, может быть приготовлена на основе минимальной среды. Примеры минимальной среды включают среды, которые аналогичны минимальной среде, использованной на вышеупомянутом этапе (1). Среда может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. При необходимости минимальная среда также может содержать витамин С (например, аскорбиновую кислоту), альбумин, инсулин, трансферрин, соединение селена (например, селенит натрия), жирную кислоту, микроэлементы, 2-меркаптоэтанол, тиоглицерин (например,  $\alpha$ -монотиоглицерин) (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Глютамакс (зарегистрированный торговый знак)), заменимые аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины, гормон и т.п.

Когда на этапе (3) используется витамин С, витамин С может быть аналогичным витамину, описанному на этапе (1), и может быть добавлен аналогичным образом. В одном из вариантов осуществления концентрация витамина С в среде или культуральной среде предпочтительно составляет от 5 до 200 мкг/мл. В другом варианте осуществления витамин С добавляют в количестве, соответствующем 5, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл в культуральной среде (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл).

Когда на этапе (3) используется гормон, примеры гормона включают кортикостероид. Кортикостероид представляет собой глюкокортикоид или его производное, и в качестве примеров можно привести ацетат кортизона, гидрокортизон, флудрокортизона ацетат, преднизолон, триамцинолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон и дипропионат беклометазона. Предпочтительным является дексаметазон. Когда кортикостероидом является дексаметазон, его концентрация в среде составляет от 1 до 100 нМ.

На этапе (3) среда содержит агонист комплекса CD3/TCR. Агонист комплекса CD3/TCR не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную передавать сигнал от

комплекса CD3/TCR в CD3-позитивную клетку путем специфического связывания по меньшей мере с частью комплекса CD3/TCR. Примеры агониста комплекса CD3/TCR включают агонист CD3 и/или агонист TCR. В качестве агониста CD3 можно указать агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент, и в качестве агониста TCR можно упомянуть по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из агонистического антитела к TCR или его связывающего фрагмента, комплекса МНС/антигенный пептид или его мультимера и комплекса МНС/суперантиген или его мультимера. Когда используется агонистическое антитело к CD3, агонистическое антитело к CD3 включает как поликлональное антитело, так и моноклональное антитело, предпочтительно моноклональное антитело. Антитело может принадлежать к любому классу иммуноглобулинов IgG, IgA, IgM, IgD и IgE, предпочтительно к IgG. В качестве агонистического антитела к CD3 можно указать продуцируемое клоном ОКТ3 антитело (ОКТ3), продуцируемое клоном UCHT1 антитело (UCHT1) и т.п., при этом предпочтительным является UCHT1. Когда агонистическое антитело к CD3 представляет собой ОКТ3, ОКТ3 включает RYTMH (SEQ ID NO: 9), YINPSRGTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 10) и YYDDHNYCLDY (SEQ ID NO: 11) в качестве определяющих комплементарность областей 1-3 варибельной области тяжелой цепи и SASSSVSYMN (SEQ ID NO: 12), DTSKLAS (SEQ ID NO: 13) и QQWSSNPFT (SEQ ID NO: 14) в качестве определяющих комплементарность областей 1-3 варибельной области легкой цепи. Кроме того, ОКТ3 предпочтительно включает варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 22. Когда агонистическое антитело к CD3 представляет собой UCHT1, UCHT1 включает GYSFTGYTMN (SEQ ID NO: 15), LINPYKGVST (SEQ ID NO: 16) и SGYYGDSWDWYFDV (SEQ ID NO: 17) в качестве определяющих комплементарность областей 1-3 варибельной области тяжелой цепи и RASQDIRNYLN (SEQ ID NO: 18), YTSRLHS (SEQ ID NO: 19) и QQGNTLPWT (SEQ ID NO: 20) в качестве определяющих комплементарность областей 1-3 варибельной области легкой цепи. Кроме того, UCHT1 предпочтительно включает варибельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, и варибельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24. Концентрация агонистического антитела к CD3 в среде составляет, например, 10-1000 нг/мл, предпочтительно 50-800 нг/мл, более предпочтительно 250-600 нг/мл.

Когда на этапе (3) используется цитокин, в качестве цитокина можно указать IL-2, IL-7 и т.п. Когда цитокин представляет собой IL-2, его концентрация в среде составляет 10-1000 Ед/мл, и когда цитокин представляет собой IL-7, его концентрация в среде составляет 1-1000 нг/мл.

На этапе (3) температурные условия культивирования не имеют особых ограничений. Температура составляет, например, от примерно 37 до примерно 42°C, предпочтительно от примерно 37 до примерно 39°C. Период культивирования может быть надлежащим образом определен специалистами в данной области путем мониторинга количества CD3-позитивных клеток и т.п. Количество дней культивирования не ограничено при условии, что могут быть получены CD3-позитивные клетки. Период культивирования составляет, например, по меньшей мере 1 день или более, 2 дня или более, 3 дня или более, 4 дня или более, 5 дней или более и предпочтительно 6 дней. Период предпочтительно составляет 28 дней или менее и более предпочтительно 14 дней или менее.

Как описано выше, CD3-позитивные клетки, подлежащие культивированию с помощью способа продуцирования или способа экспансии в культуре по настоящему изобретению, могут быть получены путем дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

Способ продуцирования или способ экспансии в культуре по настоящему изобретению включает этап культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта и агониста CD30 (далее упоминаемого как этап (I) по настоящему изобретению).

На этапе (I) по настоящему изобретению агонист комплекса CD3/TCR может быть таким же, как агонист комплекса CD3/TCR, используемый на этапе (3).

На этапе (I) по настоящему изобретению (или на этапе (3)), когда используемый агонист комплекса CD3/TCR представляет собой агонистическое антитело к CD3 или анти-TCR антитело, поликлональные антитела на их основе могут быть получены, например, следующим способом. Например, в случае анти-CD3 поликлонального антитела млекопитающих, таких как кролик, мышь, крыса, коза, морская свинка, хомяк и т.п., иммунизируют (от 1 до нескольких бустерных инъекций каждые примерно 1-4 недели после начальной иммунизации) смесью фрагмента пептида (например,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$  цепи), содержащего CD3 или его эпитоп, и полного или неполного адъюванта Фрейнда (FCA или FIA) в качестве антигена иммунизации, и в случае поликлональных антител к TCR млекопитающих иммунизируют смесью фрагмента пептида (например,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma\delta$  цепи), содержащего TCR или его эпитоп, и полного или неполного адъюванта Фрейнда (FCA или FIA) в качестве антигена иммунизации. Примерно через 3-10 дней после каждой дополнительной иммунизации титр антител в частично собранной сыворотке измеряют с помощью общеизвестной реакции антиген-антитело и подтверждают его увеличение. Кроме того, примерно через 3-10 дней после последней иммунизации собирают цельную кровь и получают очищенную антисыворотку.

ку. Поликлональные антитела также могут быть очищены в виде одного класса иммуноглобулинов с помощью обычного метода разделения, такого как высаливание (например, фракционирование сульфатом аммония), центрифугирование, диализ и колоночная хроматография.

Когда агонистическое антитело к CD3 или антитело к TCR, используемое на этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3)), представляет собой моноклональное антитело, моноклональное антитело обычно может быть получено из гибридом (слитых клеток), полученных путем слияния клеток. То есть, как и в случае вышеупомянутого поликлонального антитела, оно может быть получено путем выделения продуцирующих антитело клеток из млекопитающего, иммуносенсибилизированного к фрагменту пептида, содержащему CD3 или TCR или их эпитоп, слияния этих клеток с клетками миеломы с образованием гибридомы, клонирования гибридомы и выбора в качестве маркерного антигена клона, продуцирующего антитело, которое проявляет специфическое сродство к CD3 или TCR. Кроме того, также можно использовать продуцирующую антитело клетку, полученную путем реакции в культуральной среде CD3 со спленоцитами или лимфоцитами, выделенными заранее. В этом случае также могут быть получены происходящие от человека клетки-продуценты антител.

Гибридома, которая секретирует моноклональное антитело, может быть получена в соответствии с методом Kohler и Milstein (Nature, Vol. 256, p. 495-497, 1975) или модифицированным вариантом этого метода. Другими словами, моноклональное антитело получают путем культивирования гибридомы, полученной в результате слияния продуцирующих антитело клеток, содержащихся в спленоцитах, тимоцитах, клетках лимфатических узлов, периферических лимфоцитах, клетках миеломы или миндалины, предпочтительно спленоцитах, полученных от животных, иммуносенсибилизированных, как описано выше, предпочтительно с аллогенными клетками миеломы млекопитающих, таких как мышь, крыса, морская свинка, хомяк, кролик или человек, более предпочтительно мышь, крыса или человек. Культивирование можно осуществлять *in vitro* или *in vivo* в организме млекопитающих, таких как мышь, крыса, морская свинка, хомяк, кролик, предпочтительно мышь или крыса, более предпочтительно внутрибрюшинно в организме мыши, и антитело можно получить из супернатанта культуры или асцитной жидкости млекопитающего.

Примеры миеломных клеток, используемых для слияния клеток, включают миелому мышино происхождения (например, P3-NSI-1-Ag4-1, P3-X63-Ag8-U1, P3-X63-Ag8-653, SP2/0-Ag14, BW5147 и т.п.), миелому крысиного происхождения (например, 210RCY3-Ag1.2.3 и т.п.), миелому человеческого происхождения (например, U-266AR1, GML500-6TG-A1-2, UC729-6, CEM-AGR, D1R11 и CEM-T15 и т.п.) и т.п.

Клон гибридомы, который продуцирует моноклональное антитело, может быть подвергнут скринингу путем культивирования гибридомы, например, в планшете для микротитрования и измерения реактивности культурального супернатанта в лунке, в которой наблюдается рост гибридомы, по отношению к CD3 с помощью радиоиммуноанализа, иммуноферментного анализа, флуоресценции, иммуноанализа и т.п.

Выделение и очистку моноклонального антитела из полученного описанным выше способом культурального супернатанта или асцитной жидкости, содержащей антитело, можно выполнять с помощью ионообменной хроматографии, аффинной колоночной хроматографии, используя колонку с антииммуноглобулином или колонку с протеином G.

Моноклональное антитело, используемое на этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3) по настоящему изобретению), не может быть получено любым способом без ограничения способом продуцирования. Хотя моноклональное антитело обычно имеет сахарную цепь, структура которой отличается в зависимости от вида млекопитающего, подвергаемого иммуносенсибилизации, моноклональное антитело по настоящему изобретению не ограничено структурными различиями сахарной цепи и включает моноклональные антитела, полученные от любых млекопитающих.

Агонистическое антитело к CD3 или анти-TCR антитело включает поликлональное антитело, природное антитело, такое как моноклональное антитело (mAb), химерное антитело (гуманизированное антитело), которое может быть получено с помощью метода рекомбинации генов, одноцепочечное антитело и связывающие фрагменты этих антител. Связывающий фрагмент антитела означает область части антитела, имеющую специфическую связывающую активность, и, в частности, включает Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scAb, scFv, scFv-Fc и т.п.

Кроме того, специалисты в данной области могут получить слитое антитело, состоящее из агонистического антитела к CD3 или анти-TCR антитела или его связывающего фрагмента с другим пептидом или белком, или модифицированное антитело, с которым связан модифицирующий агент. Другие пептиды и белки, используемые для слияния, не имеют особых ограничений при условии, что связывающая активность антитела не снижается. Например, можно упомянуть человеческий сывороточный альбумин, различные пептидные метки, пептиды с искусственным спиральным мотивом, белки, связывающие мальтозу, глутатион-S-трансферазу, различные токсины, другие пептиды или белки, которые могут способствовать мультимеризации, и т.п. Модифицирующий агент, используемый для модификации, не имеет особых ограничений при условии, что он не снижает связывающую активность антитела, и его примеры включают полиэтиленгликоль, сахарную цепь, фосфолипид, липосомы, низкомолекулярное соедине-

ние и т.п.

В качестве агонистического антитела к CD3 также можно использовать коммерчески доступный реагент. Агонистическое антитело к CD3, которое является коммерчески доступным, не имеет особых ограничений, и можно использовать, например, полученное из клона ОКТ3 антитело (ОКТ3) (очищенное функциональное человеческое анти-CD3 антитело (клон: ОКТ3) (eBioscience)), полученное из клона UCHT1 антитело (UCHT1) (антитело к CD3 (клон: UCHT1) (GeneTex)) и т.п., и предпочтительно использовать UCHT1.

Когда агонист комплекса CD3/TCR, используемый на этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3)), представляет собой комплекс МНС/антигенный пептид, комплекс МНС/антигенный пептид не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, специфически распознаваемую комплексом CD3/TCR CD3-позитивных клеток, и эта молекула может передавать сигнал в CD3-позитивные клетки.

МНС, составляющий комплекс МНС/антигенный пептид, может представлять собой МНС класса I или МНС класса II, предпочтительно МНС класса I.

На этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3)) МНС класса I не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, которая образует комплекс с антигенным пептидом, распознается комплексом CD3/TCR и CD8 и передает сигнал в CD3-позитивные клетки. МНС класса I представляет собой, например, димер, состоящий из  $\alpha$ -цепи (HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G человека, H-2K, H-2D или H-2L мыши) и  $\beta_2$  микроглобулина, предпочтительно димер, состоящий из HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F или HLA-G и  $\beta_2$  микроглобулина, более предпочтительно, димер, состоящий из HLA-A, HLA-B или HLA-C и  $\beta_2$  микроглобулина. В способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению конкретные примеры МНС класса I включают, без ограничения, HLA-A\*02:01, HLA-A\*24:02, HLA-A\*01:01 и т.п. Антигенный пептид не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой пептид, презентуемый МНС класса I. В качестве антигенного пептида, презентуемого МНС класса I, можно упомянуть, например, HER-2/neu, MART-1, NY-ESO-1, Gp-100, MUC-1, p53, простатоспецифический антиген (PSA), hTERT, WT1, сурвивин, СЕА, MAGE-3, пептид, полученный из белка, происходящего из группы вирусов, сильно связанных с развитием злокачественной опухоли, и т.п., и предпочтительным является WT1-производный пептид. В качестве специфического WT1-производного пептида могут быть упомянуты RMFPNAPYL (SEQ ID NO: 1), SLGEQQYSV (SEQ ID NO: 2), CMTWNQMNL (SEQ ID NO:3), модифицированный пептид CYTWNQMNL (SEQ ID NO: 4) и т.п.

На этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3)) МНС класса II не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, которая образует комплекс с антигенным пептидом, распознается комплексом CD3/TCR и CD4 и передает сигнал в CD3-позитивные клетки. МНС класса II представляет собой, например, HLA-DR, HLA-DQ или HLA-DP человека и H-2A или H-2B мыши, каждый из которых представляет собой димер, состоящий из  $\alpha$ -цепи и  $\beta$ -цепи (например, HLA-DR состоит из HLA-DRA в качестве  $\alpha$ -цепи и HLA-DRB1 в качестве  $\beta$ -цепи), предпочтительно из HLA-DR, HLA-DQ или HLA-DP. Антигенный пептид не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой пептид, презентуемый МНС класса II. В качестве антигенного пептида, презентуемого МНС класса II, можно использовать, например, WT1, PSA, MAGE-3, СЕА, сурвивин, тирозиназу, пептид, полученный из белка, происходящего из группы вирусов, сильно связанных с развитием злокачественной опухоли, и т.п. Следует отметить, что WT1-производный пептид является предпочтительным.

МНС и/или антигенный пептид (далее упоминаемый как МНС и т.п.) может быть химически синтезированным белком или белком, синтезированным биохимическим методом в бесклеточной трансляционной системе. Альтернативно, белок может быть рекомбинантным белком, полученным из трансформанта, включающего нуклеиновую кислоту, имеющую последовательность оснований, которая кодирует МНС и т.п.

Когда МНС и т.п. получают в соответствии с известным методом пептидного синтеза, например, можно использовать любой из твердофазного метода синтеза и жидкофазного метода синтеза. Требуемый белок может быть получен путем конденсации производного аминокислоты, имеющего защитную группу, присоединенную к карбоксильной группе и функциональной группе боковой цепи, и производного аминокислоты, имеющего защищенную аминогруппу и защищенную функциональную группу боковой цепи, и удаления защитных групп.

Конденсацию и удаление защитных групп выполняют в соответствии с известными способами, например способами, описанными ниже в пунктах (1)-(5).

(1) M. Bodanszky and M.A. Ondetti: Peptide Synthesis, Interscience Publishers, New York (1966).

(2) Schroeder and Luebke: The Peptide, Academic Press, New York (1965).

(3) Nobuo Izumiya, et al.: Peptide Gosei-no-Kiso to Jikken (Basics and experiments of peptide synthesis), published by Maruzen Co. (1975).

(4) Haruaki Yajima and Shunpei Sakakibara: Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experiment) 1, Tanpakushitsu no Kagaku (Chemistry of Proteins) IV, 205 (1977).

(5) Haruaki Yajima, ed.: *Zoku Iyakuhin no Kaihatsu* (A sequel to *Development of Pharmaceuticals*), Vol. 14, *Peptide Synthesis*, published by Hirokawa Shoten.

Полученный таким образом МНС и т.п. можно очистить или выделить известным способом очистки. В данном случае в качестве примеров способа очистки могут быть упомянуты экстракция растворителем, дистилляция, колоночная хроматография, жидкостная хроматография, перекристаллизация, их комбинации и т.п.

Когда полученный таким образом МНС и т.п. находятся в свободной форме, свободная форма может быть преобразована в подходящую солевую форму известным способом или аналогичным ему способом, и, с другой стороны, когда МНС и т.п. получены в виде соли, их можно преобразовать в свободную форму или в форму другой соли известным способом или аналогичным ему способом.

Кроме того, МНС и т.п. также могут быть получены путем культивирования трансформанта, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую МНС и т.п., и отделения и очистки МНС и т.п. из полученной культуры. Нуклеиновая кислота, кодирующая МНС и т.п., может представлять собой ДНК или РНК, или химерную ДНК/РНК, и предпочтительно ДНК. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной или одноцепочечной. В случае двухцепочечной нуклеиновой кислоты можно использовать двухцепочечную ДНК, двухцепочечную РНК или гибридную ДНК:РНК. В случае одноцепочечной нуклеиновой кислоты это может быть смысловая цепь (т.е. кодирующая цепь) или антисмысловая цепь (т.е. некодирующая цепь).

Примеры ДНК, кодирующей МНС и т.п., включают геномную ДНК, кДНК полученную из клеток теплокровных животных (например, человека, крупного рогатого скота, обезьяны, лошади, свиньи, овцы, козы, собаки, кошки, морской свинки, крысы, мыши, кролика, хомяка, птицы и т.п.), синтетическую ДНК и т.п. кДНК, кодирующая МНС и т.п., может быть непосредственно амплифицирована методом полимеразной цепной реакции (далее сокращенно "метод ПЦР") с использованием в качестве матрицы фракции общей РНК или мРНК, полученной из любой клетки животных [например, гепатоцита, спленоцита, нервной клетки, глиальной клетки,  $\beta$ -клетки поджелудочной железы, миелоцита, мезангиальной клетки, клетки Лангерганса, эпидермальной клетки, эпителиальной клетки, бокаловидной клетки, эндотелиальной клетки, гладкомышечной клетки, фибробласта, фиброцита, миоцита, адипоцита, иммуноцита (например, макрофага, Т-клетки, В-клетки, естественной клетки-киллера, тучной клетки, нейтрофила, базофила, эозинофила, моноцита), мегакариоцита, синовиальной клетки, хондроцита, костной клетки, остеобласта, остеокласта, клетки молочной железы, гепатоцита, интерстициальной клетки или соответствующей клетки-предшественника, стволовой клетки или происходящих от них раковых клеток и т.д.] или любой ткани, в которой присутствуют эти клетки [например, головного мозга или любой части мозга (например, обонятельной луковицы, миндалевидного ядра, базальных ганглий, гиппокампа, таламуса, гипоталамуса, коры головного мозга, продолговатого мозга, мозжечка), спинного мозга, гипофиза, желудка, поджелудочной железы, почки, печени, гонад, щитовидной железы, желчного пузыря, костного мозга, надпочечников, кожи, легких, желудочно-кишечного тракта (например, толстой и тонкой кишки), кровеносных сосудов, сердца, тимуса, селезенки, подчелюстной слюнной железы, периферической крови, простаты, яичек, яичника, плаценты, матки, кости, сустава, жировой ткани (например, бурой жировой ткани, белой жировой ткани), скелетных мышц и т.д.], и методом полимеразой цепной реакции (далее сокращенно упоминаемой как "метод ПЦР") и ПЦР с обратной транскриптазой (далее сокращенно упоминаемой как "метод ОТ-ПЦР"). Альтернативно, кДНК, кодирующая МНС и т.п., также может быть клонирована методом гибридизации колоний или бляшек или методом ПЦР и т.п. из библиотеки кДНК, полученной путем вставки вышеупомянутой общей РНК или фрагмента мРНК в подходящий вектор. Вектор, используемый для библиотеки, может быть любым вектором, полученным из бактериофага, плазмиды, космиды, фагмиды и т.п.

ДНК, кодирующая МНС и т.п., может быть клонирована путем амплификации синтезированного ДНК-прайма, имеющего часть нуклеотидной последовательности, кодирующей МНС и т.п., методом ПЦР или путем гибридизации ДНК, включенной в подходящий вектор экспрессии, с меченым фрагментом ДНК или синтетической ДНК, кодирующей часть или всю область МНС и т.п. Гибридизацию можно осуществлять известным способом или аналогичным ему способом, например, способом, описанным в *Molecular Cloning*, 2<sup>nd</sup> ed. (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) и т.п. Когда используется коммерчески доступная библиотека, гибридизацию можно проводить в соответствии с прилагаемым руководством. Гибридизацию предпочтительно проводить в жестких условиях.

В качестве примеров очень жестких условий можно привести условия реакции гибридизации в  $6\times\text{SSC}$  (хлорид натрия/цитрат натрия) при  $45^\circ\text{C}$  с последующей промывкой  $0,2\times\text{SSC}/0,1\%$  SDS при  $65^\circ\text{C}$  один раз или более и т.п. Специалисты в данной области могут легко получить при необходимости требуемую жесткость условий путем изменения концентрации соли в растворе для гибридизации, температуры реакции гибридизации, концентрации зонда, длины зонда, количества несовпадений, времени реакции гибридизации, концентрации соли в промывочном растворе, температуры промывки и т.п. Когда используется коммерчески доступная библиотека, гибридизацию можно проводить в соответствии с методом, описанным в руководстве, прилагаемом к библиотеке.

Вектор экспрессии, содержащий ДНК, которая кодирует МНС и т.п., может быть получен, например, путем вырезания требуемого фрагмента ДНК из ДНК, которая кодирует МНС и т.п., и присоединения этого фрагмента ДНК ниже промотора в соответствующем векторе экспрессии.

В качестве вектора экспрессии используются плазмиды, происходящие от *Escherichia coli* (например, pBR322, pBR325, pUC12, pUC13); плазмиды, применяемые для экспрессии в клетках животных (например, pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo); векторы на основе вирусов животных, таких как ретровирус, вирус осповакцины, аденовирус, лентивирус и т.п.; и т.п.

Промотор может быть любым промотором, если он подходит для хозяина, используемого для экспрессии гена.

Например, когда хозяином является клетка животного, используются промотор SRa, промотор SV40, промотор LTR, промотор CMV (цитомегаловируса), промотор RSV (вируса саркомы Рауса), LTR MoMuLV (вируса мышинного лейкоза Молони), промотор HSV-TK (тимидинкиназы вируса простого герпеса) и т.п. Из них предпочтительными являются промотор CMV, промотор SR1 и т.п.

Когда хозяином является бактерия рода *Escherichia*, предпочтительными являются промотор trp, промотор lac, промотор gesA, промотор  $\lambda P_L$ , промотор lpp, промотор T7 и т.п.

В контексте настоящего описания векторы экспрессии включают, в дополнение к вышеупомянутому, векторы экспрессии, которые обязательно содержат энхансер, сигнал сплайсинга, сигнал добавления полиА, селективный маркер, точку начала репликации SV40 (далее также сокращенно SV40 ori) и т.п. В качестве примеров селективных маркеров можно привести ген дигидрофолатредуктазы (далее также сокращенно упоминаемый как dhfr) [устойчивости к метотрексату (MTX)], ген устойчивости к ампициллину (далее также сокращенно упоминаемый как ampr), ген устойчивости к неомицину (далее также сокращенно упоминаемый как neog, устойчивости к G418) и т.п. В частности, когда используется клетка китайского хомячка, дефектная по гену dhfr, и ген dhfr используют в качестве селективного маркера, целевой ген также может быть выбран с помощью среды, не содержащей тимидин.

При необходимости к 5'-концу ДНК, кодирующей МНС и т.п., может быть добавлена (или заменена нативным сигнальным кодоном) нуклеотидная последовательность, кодирующая сигнальную последовательность, подходящую для хозяина (сигнальный кодон). Например, когда хозяином является род *Escherichia*, используются сигнальная последовательность PhoA, сигнальная последовательность OmpA и т.п.; когда хозяином является клетка животного, используются сигнальная последовательность инсулина, сигнальная последовательность  $\alpha$ -интерферона, сигнальная последовательность молекулы антитела и т.п.

МНС и т.п. могут быть получены путем трансформации хозяина вектором экспрессии, содержащим вышеупомянутую ДНК, кодирующую МНС и т.п., и культивированием полученного трансформанта.

В качестве хозяина используют, например, род *Escherichia*, животную клетку и т.п.

В качестве рода *Escherichia* используют, например, K12 DH1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 60, 160 (1968)], JM103 [Nucleic Acids Research, vol. 9, 309 (1981)], JA221 [Journal of Molecular Biology, vol. 120, 517 (1978)], HB101 [Journal of Molecular Biology, vol. 41, 459 (1969)], C600 [Genetics, vol. 39, 440 (1954)] и т.п.

В качестве животной клетки могут быть использованы, например, клетка COS-7 обезьяны, клетка Vero обезьяны, клетка яичника китайского хомячка (далее сокращенно упоминаемая как клетка CHO), клетка CHO с дефектным геном dhfr (далее сокращенно упоминаемая как клетка CHO(dhfr-)), мышьяная L-клетка, мышьяная клетка AtT-20, клетка мышьяной миеломы, клетка GH3 крысы, человеческая клетка FL и т.п.

Трансформацию можно осуществлять известным способом в соответствии с видом хозяина.

Род *Escherichia* можно трансформировать, например, в соответствии со способами, описанными в Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 69, 2110 (1972), Genee, vol. 17, 107 (1982) и т.п.

Клетки животных можно трансформировать, например, способом, описанным Saibo Kogaku в дополнительном выпуске 8, Shin Saibo Kogaku Jikken Protocol, 263-267 (1995), опубликованном Shujunsha, или Virology, 52, 456 (1973).

Культивирование трансформанта можно осуществлять известным способом в соответствии с типом хозяина.

В качестве примера среды, используемой для культивирования трансформанта, хозяином которого является бактерия рода *Escherichia*, предпочтительной является среда M9, дополненная глюкозой и аминокислотой cas [Miller, Journal of Experiments in Molecular Genetics, 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972]. При необходимости для увеличения эффективности промотора в среду можно добавить химический агент, такой как 3'-индолилукриловая кислота.

Культивирование трансформанта, хозяином которого является бактерия рода *Escherichia*, обычно осуществляют при температуре от примерно 15 до примерно 43°C в течение от примерно 3 до примерно 24 ч. При необходимости культуру можно аэрировать или взбалтывать.

В качестве среды, используемой при культивировании трансформанта, хозяином которого является клетка животного, используют, например, минимальную основную среду (MEM), содержащую примерно

5-20% фетальной бычьей сыворотки [Science, vol. 122, 501 (1952)], среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM) [Virology, vol. 8, 396 (1959)], среду RPMI1640 [The Journal of the American Medical Association, vol. 199, 519 (1967)], среду 199 [Proceeding of the Society for the Biological Medicine, vol. 73, 1 (1950)] и т.п. Значение pH среды предпочтительно находится в диапазоне от примерно 6 до примерно 8. Культивирование обычно проводят при температуре от примерно 30 до примерно 40°C в течение от примерно 15 до примерно 60 ч. При необходимости культуру можно аэрировать или взбалтывать.

Как описано выше, МНС и т.п. можно продуцировать в клетке-трансформанте или вне клетки.

МНС и т.п. можно отделить и очистить от культуры, полученной культивированием трансформанта, известным способом.

Например, когда МНС или т.п. экстрагируют из культивированной бактерии или цитоплазмы клетки, используют соответствующий способ, согласно которому бактерии или клетки собирают из культуры известными способами, суспендируют в соответствующем буферном растворе и разрушают путем обработки ультразвуком, лизоцимом и/или используя циклы замораживание-оттаивание и т.п., после чего центрифугированием или фильтрацией получают неочищенный экстракт растворимого белка. Буферный раствор может содержать агент, денатурирующий белок, такой как гидрохлорид мочевины или гуанидин, и поверхностно-активное вещество, такое как Тритон X-100. Кроме того, когда МНС или т.п. секретируется во вне бактерий (клетки), используют способ отделения культурального супернатанта от культуры путем центрифугирования, фильтрации и т.п.

Выделение и очистка МНС и т.п., содержащихся в полученной таким образом растворимой фракции и культуральном супернатанте, можно выполнить известным способом. Полезные способы включают способы, основанные на растворимости, такие как высаливание и осаждение растворителем; способы, основанные в основном на разнице молекулярных масс, такие как диализ, ультрафильтрация, гель-фильтрация и электрофорез в SDS-полиакриламидном геле; способы, основанные на разнице зарядов, такие как ионообменная хроматография; способы, основанные на специфическом сродстве, такие как аффинная хроматография; способы, основанные на разнице величин гидрофобности, такие как обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; и способы, основанные на разнице изоэлектрических точек, такие как изоэлектрическая фокусировка. При необходимости эти способы можно комбинировать.

Комплекс МНС/антигенный пептид, полученный, как описано выше, может представлять собой мультимер. Благодаря мультимеризации комплекса МНС/антигенный пептид можно ожидать проявление более сильного агонистического эффекта в отношении TCR. Известен способ мультимеризации комплекса МНС/антигенный пептид по настоящему изобретению. Например, комплекс МНС/антигенный пептид, модифицированный биотином, может быть тетрамеризован через тетрамер авидина или стрептавидина. Альтернативно, комплекс МНС/антигенный пептид также может быть мультимеризован путем лигирования с декстраном.

Когда агонист комплекса CD3/TCR, используемый на этапе (I) по настоящему изобретению (или этапе (3)), представляет собой комплекс МНС/суперантиген, комплекс МНС/суперантиген представляет собой комплекс МНС класса II с суперантигеном. В качестве суперантигена могут быть упомянуты стафилококковый энтеротоксин, стрептококковый пирогенный экзотоксин, токсин синдрома токсического шока и т.п. МНС и суперантиген могут быть получены таким же способом, как описано для МНС и т.п. Комплекс МНС/суперантиген может представлять собой мультимер, аналогичный комплексу МНС/антигенный пептид. Способ мультимеризации комплекса МНС/суперантиген по настоящему изобретению является таким же, как способ мультимеризации комплекса МНС/антигенный пептид.

Агонист комплекса CD3/TCR, используемый на этапе (I) по настоящему изобретению, может присутствовать в любой форме при условии, что он может контактировать с комплексом CD3/TCR на поверхности CD3-позитивной клетки во время культивирования. Например, он может содержаться в среде во время культивирования или может быть иммобилизован на культуральном контейнере, предпочтительно иммобилизован на культуральном контейнере.

Когда в среде содержится агонист комплекса CD3/TCR, среда не имеет особых ограничений при условии, что в ней можно культивировать CD3-позитивные клетки. Включены, например, минимальная питательная среда Глазго (Glasgow's Minimal Essential medium, GMEM), среда IMDM, среда 199, минимальная питательная среда Игла (EMEM), среда  $\alpha$ MEM, среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), среда F12 Ham, среда RPMI 1640, среда Фишера, нейробазальная среда (Life Technologies) и смеси этих сред и т.п. Среда может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. Когда содержится сыворотка, нижний предел концентрации сыворотки (например, фетальной бычьей сыворотки (FBS), сыворотки человека и т.п.) обычно составляет не менее 1%, предпочтительно не менее 5%, и верхний предел обычно составляет не более 20%, предпочтительно не более 15%. При необходимости среда может содержать один или более заменителей сыворотки, таких как нокаутный заменитель сыворотки (Knockout Serum Replacement, KSR) (сывороточный заменитель FBS при культивировании ES-клеток), добавку N2 (Invitrogen), добавку B27 (Invitrogen), альбумин, инсулин, трансферрин, соединения селена (например, селенит натрия), витамин С (например, аскорбиновую кислоту), апотрансферрин,

жирную кислоту, предшественник коллагена, микроэлемент, 2-меркаптоэтанол, 3'-тиолглицерин и т.п., и одно или более веществ, таких как липид, аминокислота, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Глютамакс (зарегистрированный торговый знак)), заменимая аминокислота, витамин, фактор роста, низкомолекулярное соединение, антибиотик (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксидант, пировиноградная кислота, буферный агент, неорганические соли, селеновая кислота, прогестерон, путресцин и т.п. Когда в среде содержится агонист комплекса CD3/TCR, нижний предел концентрации агониста комплекса CD3/TCR может составлять не менее 0,3 нг/мл, предпочтительно не менее 3 нг/мл, и верхний предел может составлять не более 10000 нг/мл, предпочтительно не более 1000 нг/мл. В частности, когда агонист комплекса CD3/TCR представляет собой агонистическое антитело к CD3, концентрация агонистического антитела к CD3 в среде составляет, например, от 10 до 1000 нг/мл. Культивирование можно проводить, например, в CO<sub>2</sub> инкубаторе в атмосфере с концентрацией CO<sub>2</sub> от примерно 1 до примерно 10%, предпочтительно от примерно 2 до примерно 5% примерно при 30-40°C, предпочтительно примерно 37°C. Период культивирования в среде, содержащей агонист комплекса CD3/TCR, может быть определен соответствующим образом специалистами в данной области путем мониторинга количества CD3-позитивных клеток и т.п. Количество дней не ограничено при условии возможности получения CD3-позитивных клеток. Период культивирования составляет, например, по меньшей мере 6 ч или более, 12 ч или более, 16 ч или более, 24 ч или более, 48 ч или более, 72 ч или более, предпочтительно 16-72 ч. Кроме того, предпочтительным периодом является 14 дней или более и более предпочтительным 7 дней или более.

Когда используется витамин С, предпочтительно добавляют (обеспечивают) витамин С каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день. Витамин С более предпочтительно добавлять каждый день. В одном из вариантов осуществления витамин С предпочтительно добавляют в среду в количестве, соответствующем от 5 до 500 нг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 нг/мл). В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5-500 мкг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл).

Среда, используемая на этапе (I) по настоящему изобретению, может дополнительно содержать цитокин. Цитокин, содержащийся в среде, не имеет особых ограничений, и можно упомянуть по меньшей мере один, выбранный из IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21. Предпочтительно, когда содержатся все IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21. Нижний предел концентрации цитокина составляет не менее 0,1 нг/мл, предпочтительно не менее 10 нг/мл, и верхний предел составляет не более 1000 нг/мл, предпочтительно не более 300 нг/мл. Когда используются эти цитокины, концентрация в среде составляет 1-100 нг/мл для IL-7, 1-100 нг/мл для IL-15, 5-500 нг/мл для IL-18 и 2-200 нг/мл для IL-21.

Среда, используемая на этапе (I) по настоящему изобретению, может дополнительно содержать TL1A и/или IL-12. В этом случае концентрация TL1A в среде составляет 5-500 нг/мл и концентрация IL-12 в среде составляет 5-500 нг/мл.

Среда, используемая на этапе (I) по настоящему изобретению в качестве цитокина, может содержать цитокин семейства TNF. Примеры цитокинов семейства TNF включают TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , лимфотоксин  $\alpha$ , лиганд Fas, TRAIL, TWEAK, TL1A, лиганд RANK, лиганд OX40, APRIL, AITRL, BAFF, 4-1BBL и лиганд CD40 и т.п.; предпочтительным является TL1A. Когда используется TL1A, его концентрация в среде может составлять от 5 до 500 нг/мл.

В качестве ингибитора апоптоза, используемого на этапе (I) по настоящему изобретению, можно упомянуть ингибитор протеазы, например ингибитор каспазы. В качестве ингибитора каспазы предпочтительным является ингибитор панкаспазы FMK Z-VAD (N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp (O-Me)-фторметилкетон), и его концентрация в среде может составлять 1-1000 мкМ.

Когда агонист комплекса CD3/TCR иммобилизован на культуральном контейнере, культуральный контейнер не имеет особых ограничений при условии, что в нем можно культивировать CD3-позитивные клетки, и можно использовать контейнер, предметное стекло, гранулу или их комбинацию. Примеры культурального контейнера включают колбу, колбу для тканевой культуры, чашку, чашку Петри, чашку для тканевой культуры, многоруночный планшет, микропланшет, планшет с микролунками, мультичашки, чашки с микролунками, предметное стекло, предметное стекло с лунками, чашку Петри, пробирку, лоток, культуральный мешок, роллерный флакон, микрогранулу и т.п.

Агонист комплекса CD3/TCR может быть иммобилизован на культуральном контейнере известными способами. Например, агонист комплекса CD3/TCR может быть иммобилизован на культуральном контейнере путем растворения агониста комплекса CD3/TCR в растворителе (например, PBS и т.п.), добавления его в культуральный контейнер и выдерживания при 4°C в течение ночи. Концентрация раствора агониста комплекса CD3/TCR для его иммобилизации на культуральном контейнере может быть определена соответствующим образом специалистами в данной области в соответствии с типом агониста комплекса CD3/TCR. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения, например, когда агонист комплекса CD3/TCR представляет собой агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент, раствор агонистического антитела к CD3 или связывающего фрагмента, контактирующего с

культуральным контейнером, составляет 0,3-10000 нг/мл, более предпочтительно 3-5000 нг/мл, еще более предпочтительно 3-3000 нг/мл и особенно предпочтительно 3-600 нг/мл. В другом варианте осуществления настоящего изобретения концентрация агонистического антитела к CD3 или его связывающего фрагмента в растворе составляет, например, 10-10000 нг/мл, предпочтительно 50-5000 нг/мл, более предпочтительно 200-4000 нг/мл. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация агонистического антитела к CD3 или его связывающего фрагмента в растворе составляет, например, 1-50000 нг/мл, предпочтительно 3-30000 нг/мл, более предпочтительно 30-30000 нг/мл, еще более предпочтительно 300-30000 нг/мл. Когда агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент представляет собой полученное из клона ОКТ3 антитело (ОКТ3) или его связывающий фрагмент, его концентрация в растворе составляет, например, 1-50000 нг/мл, предпочтительно 10-10000 нг/мл, более предпочтительно 50-5000 нг/мл, еще более предпочтительно 200-4000 нг/мл. Когда агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент представляет собой полученное из клона UCHT1 антитело (UCHT1) или его связывающий фрагмент, его концентрация в растворе составляет, например, 1-50000 нг/мл, предпочтительно 3-30000 нг/мл, более предпочтительно 30-30000 нг/мл, еще более предпочтительно 300-30000 нг/мл.

На этапе (I) по настоящему изобретению фибронектин не имеет особых ограничений при условии, что он является молекулой, способной связываться с CD3-позитивными клетками. Вариант фибронектина не имеет особых ограничений при условии, что он является молекулой, способной связываться с VLA-5 и VLA-4 на поверхности CD3-позитивных клеток, и его примеры включают РетроНектин (зарегистрированный торговый знак).

Фибронектин или его вариант для применения на этапе (I) по настоящему изобретению могут присутствовать в любой форме при условии, что они могут контактировать с CD3-позитивными клетками во время культивирования, аналогично агонисту комплекса CD3/TCR. Например, фибронектин или его вариант могут содержаться в среде во время культивирования или могут быть иммобилизованы на культуральном контейнере, предпочтительно они иммобилизованы на культуральном контейнере.

Когда фибронектин или его вариант содержится в среде, среда может быть такой же, как среда, содержащая агонист комплекса CD3/TCR. Присутствие или отсутствие сыворотки, добавки и т.п. может быть таким же, как и в среде, содержащей агонист комплекса CD3/TCR. Когда фибронектин или его вариант содержится в среде, нижний предел концентрации фибронектина или его варианта может быть не менее 10 нг/мл, предпочтительно не менее 100 нг/мл, и верхний предел может быть не более 10000 мкг/мл, предпочтительно не более 1000 мкг/мл.

Когда фибронектин или его вариант иммобилизован на культуральном контейнере, культуральный контейнер может быть таким же, как контейнер, на котором иммобилизован агонист комплекса CD3/TCR. Кроме того, иммобилизация фибронектина или его варианта на культуральном контейнере может быть такой же, как иммобилизация агониста комплекса CD3/TCR. Процесс иммобилизации фибронектина или его варианта на культуральном контейнере может быть таким же, как для агониста комплекса CD3/TCR. Концентрация раствора фибронектина или его варианта при иммобилизации фибронектина или его варианта на культуральном контейнере может быть определена соответствующим образом специалистами в данной области в соответствии с фибронектином или его вариантом. Например, если фибронектин или его вариант представляет собой РетроНектин (зарегистрированный торговый знак), раствор РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), который контактирует с культуральным контейнером, предпочтительно составляет 0,1-10000 мкг/мл. В этом случае концентрация раствора РетроНектина более предпочтительно составляет 0,1-1000 мкг/мл, еще более предпочтительно 1-300 мкг/мл, особенно предпочтительно 1-150 мкг/мл.

На этапе (I) по настоящему изобретению агонист CD30 не имеет особых ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную передавать сигнал от CD30 в клетку путем специфического связывания с CD30. Примеры агониста CD30 включают по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из агонистического антитела к CD30 или связанного с ним фрагмента и лиганда CD30 или связанного с ним фрагмента.

Тип, способ продуцирования и т.п. агонистического антитела к CD30 и его связывающего фрагмента, используемые на этапе (I) по настоящему изобретению, могут быть такими же, как для агонистического антитела к CD3 и анти-TCR антитела.

Лиганд CD30 или его связывающий фрагмент, используемый на этапе (I) по настоящему изобретению, представляет собой, например, CD153. Лиганд CD30 или его связывающий фрагмент можно получить способом, аналогичным способу получения МНС и/или антигенного пептида.

Агонист CD30, используемый на этапе (I) по настоящему изобретению, может присутствовать в любой форме при условии, что он может находиться в контакте с CD30 во время культивирования. Например, он может содержаться в среде во время культивирования или может быть иммобилизован на культуральном контейнере и предпочтительно содержится в среде.

Когда в среде содержится агонист CD30, среда может быть такой же, как среда, содержащая агонист комплекса CD3/TCR. Присутствие или отсутствие сыворотки, добавки и т.п. может быть таким же, как и в среде, содержащей агонист комплекса CD3/TCR. Когда агонист CD30 содержится в среде, кон-

центрация агониста CD30 в среде может быть надлежащим образом определена специалистами в данной области в соответствии с типом агониста CD30. Например, когда агонист CD30 представляет собой агонистическое антитело к CD30 или его связывающий фрагмент, концентрация агонистического антитела к CD30 или его связывающего фрагмента в среде обычно составляет от 1 до 10000 нг/мл, предпочтительно от 1 до 1000 нг/мл, более предпочтительно от 3 до 300 нг/мл, еще более предпочтительно от 30 до 300 нг/мл.

Когда агонист CD30 иммобилизован на культуральном контейнере, культуральный контейнер может быть таким же, как контейнер, на котором иммобилизован агонист комплекса CD3/TCR. Кроме того, способ иммобилизации агониста CD30 на культуральном контейнере может быть таким же, как способ иммобилизации агониста комплекса CD3/TCR. Нижний предел концентрации раствора агониста CD30, когда агонист CD30 иммобилизован на культуральном контейнере, может составлять не менее 0,1 нг/мл, предпочтительно не менее 1 нг/мл, и верхний предел может составлять не более 10000 нг/мл, предпочтительно не более 1000 нг/мл.

Способ продуцирования или способ экспансии в культуре по настоящему изобретению может дополнительно включать этап культивирования CD3-позитивных клеток, которые были культивированы на этапе (I) по настоящему изобретению, в отсутствие агониста комплекса CD3/TCR и фибронектина или его варианта, и в присутствии агониста CD30 (далее упоминаемый как этап (II) по настоящему изобретению).

В качестве среды на этапе (II) по настоящему изобретению можно использовать среду, используемую на вышеупомянутом этапе (I). Среда может содержать сыворотку или может быть бессывороточной. Когда содержится сыворотка, нижний предел концентрации сыворотки (например, фетальной бычьей сыворотки (FBS), сыворотки человека и т.п.) обычно составляет не менее 1%, предпочтительно не менее 5%, и верхний предел обычно составляет не более 20%, предпочтительно не более 15%. При необходимости среда может содержать один или более заменителей сыворотки, таких как нокаутный заменитель сыворотки (KSR) (сывороточный заменитель FBS при культивировании ES-клеток), добавку N2 (Invitrogen), добавку B27 (Invitrogen), альбумин, инсулин, трансферрин, соединения селена (например, селенит натрия), витамин С (например, аскорбиновую кислоту), апотрансферрин, жирную кислоту, предшественник коллагена, микроэлемент, 2-меркаптоэтанол, 3'-тиолглицерин и т.п., и одно или более веществ, таких как липид, аминокислота, L-глутамин, Глутамакс (Invitrogen), заменимая аминокислота, витамин, фактор роста, низкомолекулярное соединение, антибиотик, антиоксидант, пировиноградная кислота, буферный агент, неорганические соли, селеновая кислота, прогестерон, путресцин и т.п. Культивирование можно проводить, например, в CO<sub>2</sub> инкубаторе в атмосфере с концентрацией CO<sub>2</sub> от примерно 1 до примерно 10%, предпочтительно от примерно 2 до примерно 5% примерно при 30-40°C, предпочтительно примерно 37°C. Специалисты в данной области техники могут определить соответствующим образом период культивирования путем мониторинга количества CD3-позитивных клеток и т.п. Количество дней не ограничено при условии возможности получения CD3-позитивных клеток. Период культивирования составляет, например, не менее 3 суток, не менее 5 суток, не менее 7 суток, не менее 10 суток, не менее 14 суток, не менее 21 суток, предпочтительно не менее 5 суток и не более 15 дней. Предпочтительно этот период составляет не более 30 дней, более предпочтительно не более 21 дня.

Когда используется витамин С, витамин С предпочтительно добавляют (обеспечивают) каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день. Витамин С более предпочтительно добавлять каждый день. В одном из вариантов осуществления витамин С добавляют к среде в количестве, соответствующем от 5 до 500 нг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 или 500 нг/мл). В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5-500 мкг/мл (например, в количестве, соответствующем 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 мкг/мл).

Среда, используемая на этапе (II) по настоящему изобретению, может дополнительно содержать цитокин. Цитокин не имеет особых ограничений, и может быть упомянут по меньшей мере один, выбранный из IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21. Предпочтительно, когда содержатся все IL-7, IL-15, IL-18 и IL-21. Нижний предел концентрации цитокина может составлять не менее 0,1 нг/мл, предпочтительно не менее 10 нг/мл, и верхний предел может составлять не более 1000 нг/мл, предпочтительно не более 300 нг/мл. Когда используются эти цитокины, концентрация в среде может составлять 1-100 нг/мл для IL-7, 1-100 нг/мл для IL-15, 5-500 нг/мл для IL-18 и 2-200 нг/мл для IL-21.

Среда, используемая на этапе (II) по настоящему изобретению, может дополнительно содержать TL1A и/или IL-12. В этом случае концентрация TL1A в среде может составлять от 5 до 500 нг/мл и концентрация IL-12 в среде может составлять от 5 до 500 нг/мл.

Среда, используемая на этапе (II) по настоящему изобретению, может дополнительно содержать ингибитор апоптоза. В качестве ингибитора апоптоза можно упомянуть ингибитор протеазы, например ингибитор каспазы. В качестве ингибитора каспазы предпочтительным является ингибитор панкаспазы FMK Z-VAD (N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp (O-Me)-фторметилкетон) (далее иногда упоминаемый

как "Z-VAD-FMK"), и его концентрация в среде может составлять 1-1000 мкМ, предпочтительно 1-500 мкМ, более предпочтительно 1-200 мкМ, особенно предпочтительно 1-50 мкМ.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вышеупомянутые этап (I) и этап (II) могут повторяться в этом порядке.

Настоящее изобретение также относится к CD3-позитивным клеткам, полученным способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению (далее упоминаемым как CD3-позитивные клетки по настоящему изобретению). CD3-позитивная клетка по настоящему изобретению является такой же, как CD3-позитивная клетка, полученная способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к набору для экспансии в культуре CD3-позитивных клеток, содержащему следующее (далее упоминаемому как набор по настоящему изобретению):

(1) культуральный контейнер, содержащий агонист комплекса CD3/TCR, и фибронектин или его вариант, иммобилизованный на нем, и

(2) среду, содержащую агонист CD30.

Агонист комплекса CD3/TCR, фибронектин или его вариант, агонист CD30, культуральный контейнер и среда, содержащиеся в наборе по настоящему изобретению, могут быть такими же, как те, что описаны для способа продуцирования или способа экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к способу поддержания CD3-позитивных клеток в виде CD3-позитивных CD197-позитивных клеток, включая этап стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивных клетках (далее упоминаемому как способ поддержания по настоящему изобретению).

Обычно, когда наивные Т-клетки периферической крови стимулируют антигеном, представленным дендритными клетками, происходит активация внутриклеточными сигналами наивных Т-клеток, повторная пролиферация и созревание и затем дифференцировка в Т-клетки памяти стволовых клеток, Т-клетки центральной памяти, эффекторные Т-клетки памяти и эффекторные Т-клетки. Эффекторные Т-клетки продуцируют цитокин в случае CD3-позитивных CD4-позитивных CD8-негативных клеток (хелперных Т-клеток) и убивают клетки-мишени посредством антигена в случае CD3-позитивных CD4-негативных CD8-позитивных клеток (цитотоксических Т-клеток), но долго не живут. Однако, стимулируя сигнал CD30 в Т-клетках, Т-клетки можно поддерживать в виде саморазмножающихся наивных Т-клеток или стволовых Т-клеток памяти (CD197-позитивных, CD45RA-позитивных) или центральных Т-клеток памяти (CD197-позитивных, CD45RA-негативных), которые можно дифференцировать в эффекторные Т-клетки.

CD3-позитивные клетки, культивируемые способом поддержания по настоящему изобретению, могут быть такими же, как CD3-позитивные клетки, культивируемые способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению. Предпочтительно, чтобы CD3-позитивная клетка была CD3-позитивной CD197-позитивной клеткой.

Способ поддержания по настоящему изобретению включает этап стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивных клетках. Способ стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивных клетках не имеет особых ограничений при условии, что сигнал может передаваться ниже через внутриклеточный домен CD30. Примеры способа включают способ, включающий этап культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста CD30 (далее упоминаемый как поддерживающий способ (1) по настоящему изобретению). CD3-позитивные клетки можно поддерживать как CD3-позитивные CD197-позитивные клетки с помощью поддерживающего способа (1) по настоящему изобретению.

В одном из вариантов поддерживающего способа (1) по настоящему изобретению CD3-позитивные клетки можно поддерживать как CD3-позитивные CD197-позитивные CD45RA-негативные клетки.

Агонист CD30 и условия культивирования, используемые в поддерживающем способе (1) по настоящему изобретению, могут быть такими же, как те, которые используются в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему агонист CD30 для поддержания CD3-позитивных клеток как CD3-позитивные CD197-позитивные клетки (далее упоминаемому как поддерживающий набор по настоящему изобретению).

Агонист CD30, содержащийся в поддерживающем наборе по настоящему изобретению, может быть таким же, как агонист CD30, используемый в поддерживающем способе (1) по настоящему изобретению.

В поддерживающем способе по настоящему изобретению другой способ стимуляции сигнала CD30 в CD3-позитивной клетке представляет собой, например, способ, включающий этап культивирования CD3-позитивных клеток, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор, содержащий внутриклеточный домен CD30, в присутствии антигена, который стимулирует химерный антигенный рецептор (далее упоминаемый как поддерживающий способ (2) по настоящему изобретению). Сигнал может передаваться ниже через внутриклеточный домен CD30 путем стимуляции химерного антигенного рецептора, содержащего внутриклеточный домен CD30, и CD3-позитивные клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор, содержащий внутриклеточный домен CD30, могут поддерживаться как CD3-позитивные CD197-позитивные клетки.

В одном из вариантов поддерживающего способа (2) по настоящему изобретению CD3-позитивные

клетки, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор, содержащий внутриклеточный домен CD30, можно поддерживать как CD3-позитивные CD197-позитивные CD45RA-негативные клетки.

Условия культивирования, используемые в поддерживающем способе (2) по настоящему изобретению, могут быть такими же, как условия, используемые в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Антиген, который стимулирует рецептор химерного антигена, используемый в поддерживающем способе (2) по настоящему изобретению, не имеет особых ограничений при условии, что сигнал может передаваться ниже через внутриклеточный домен CD30, содержащийся в химерном антигенном рецепторе. Антиген, который стимулирует химерный антигенный рецептор, может быть таким же, как антиген, нацеленный на химерный антигенный рецептор CD3-позитивных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор, культивируемых способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к химерному антигенному рецептору, содержащему антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный сигнальный домен, при этом внутриклеточный сигнальный домен содержит внутриклеточный домен CD30 или его мутант (далее упоминаемому как химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению).

Антигенсвязывающий домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, может быть таким же, как антигенсвязывающий домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе, экспрессируемом на CD3-позитивных клетках, культивируемых способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Трансмембранный домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, может быть таким же, как трансмембранный домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе, экспрессируемом на CD3-позитивных клетках, культивируемых способом продуцирования или способом экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Внутриклеточный сигнальный домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, содержит внутриклеточный домен CD30 или его мутант. Внутриклеточный домен CD30 не имеет особых ограничений при условии, что антигенсвязывающий домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, распознает антиген и сохраняет функцию передачи его сигнала узнавания в клетки. Например, можно упомянуть пептид, содержащий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6.

Хотя мутант внутриклеточного домена CD30 не имеет особых ограничений при условии, что он может сохранять вышеупомянутую функцию, можно упомянуть, например, пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую гомологию не менее примерно 90%, предпочтительно не менее примерно 95%, более предпочтительно не менее примерно 97%, особенно предпочтительно не менее примерно 98%, наиболее предпочтительно не менее примерно 99%, с аминокислотной последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 6. Используемый в настоящем описании термин "гомология" может быть таким же, как в случае аминокислотной последовательности "IL-15/IL-15R $\alpha$ ".

Кроме того, мутант внутриклеточного домена CD30 также включает, например, белок, содержащий (1) аминокислотную последовательность, в которой одна или более (предпочтительно от 1 до примерно 100, предпочтительно от 1 до примерно 50, более предпочтительно от 1 до примерно 10, особенно предпочтительно от 1 до нескольких (2, 3, 4 или 5)) аминокислот в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6, удалены; (2) аминокислотную последовательность, в которой одна или более (предпочтительно от 1 до примерно 100, предпочтительно от 1 до примерно 50, более предпочтительно от 1 до примерно 10, особенно предпочтительно от 1 до нескольких (2, 3, 4 или 5)) аминокислот добавлены к аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6; (3) аминокислотную последовательность, в которой одна или более (предпочтительно от 1 до примерно 50, предпочтительно от 1 до примерно 10, более предпочтительно от 1 до нескольких (2, 3, 4 или 5)) аминокислот вставлены в аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6; (4) аминокислотную последовательность, в которой одна или более (предпочтительно от 1 до примерно 50, предпочтительно от 1 до примерно 10, более предпочтительно от 1 до нескольких (2, 3, 4 или 5)) аминокислот заменены другими аминокислотами в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 6; или (5) аминокислотную последовательности, которая представляет собой их комбинацию, и т.п. Когда аминокислотная последовательность вставлена, удалена или заменена, как указано выше, положение вставки, делеции или замены не имеет особых ограничений при условии сохранения функции внутриклеточного домена CD30.

Внутриклеточный сигнальный домен, содержащийся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, может содержать внутриклеточный домен CD30 или его мутант и, кроме того, внутриклеточный домен, полученный из другого белка. Дополнительно содержащийся внутриклеточный домен может быть таким же, как внутриклеточный домен, содержащийся во внутриклеточном сигнальном домене, который содержится в химерном антигенном рецепторе, экспрессируемом на CD3-позитивных клетках, культивируемых в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению. Дополнительно содержащийся внутриклеточный домен не имеет особых ограничений и

предпочтительно является внутриклеточным доменом, полученным из CD28 или CD3ζ-цепи.

Химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению может иметь спейсер, включенный между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом или между внутриклеточным сигнальным доменом и трансмембранным доменом. Спейсер может быть таким же, как спейсер, содержащийся в химерном антигенном рецепторе, экспрессируемом на CD3-позитивных клетках, культивируемых в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Конкретные примеры химерного антигенного рецептора по настоящему изобретению включают химерный антигенный рецептор, содержащий распознающий CD19 scFv в качестве антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен CD8 в качестве трансмембранного домена, внутриклеточный домен, происходящий из CD28, в качестве внутриклеточного сигнального домена, внутриклеточный домен, происходящий из CD30, и внутриклеточный домен, происходящий из CD3ζ-цепи. Порядок вышеупомянутых внутриклеточных доменов, содержащихся во внутриклеточном сигнальном домене, не имеет особых ограничений; возможен, например, следующий порядок: внутриклеточный домен, происходящий из CD28, внутриклеточный домен, происходящий из CD30, и внутриклеточный домен, происходящий из CD3ζ-цепи. Более конкретно, химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению состоит, например, из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 7.

Химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению может быть химически синтезированным белком или белком, синтезированным биохимическим путем в бесклеточной трансляционной системе, или может быть рекомбинантным белком, полученным из трансформанта, включающего нуклеиновую кислоту, имеющую нуклеотидную последовательность, которая кодирует химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению. Химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, аналогично, может быть получен, выделен и очищен в соответствии со способом получения МНС и/или антигенного пептида, используемым в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, содержащей полинуклеотид, кодирующий химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению (далее упоминаемой как нуклеиновая кислота по настоящему изобретению).

Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может представлять собой ДНК или РНК, или химерную ДНК/РНК. Предпочтительной является ДНК. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной или одноцепочечной. В случае двухцепочечной нуклеиновой кислоты можно использовать двухцепочечную ДНК, двухцепочечную РНК или гибрид ДНК РНК. В случае одноцепочечной нуклеиновой кислоты, она может представлять собой смысловую цепь (т.е. кодирующую цепь) или анти-смысловую цепь (т.е. некодирующую цепь).

Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть получена с помощью полимеразной цепной реакции (далее сокращенно упоминаемой как "метод ПЦР"). Во-первых, геномная ДНК или кДНК кодирует каждый домен из антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена, которые содержатся в химерном антигенном рецепторе по настоящему изобретению, кДНК также можно напрямую амплифицировать методами ПЦР и ПЦР с обратной транскриптазой (далее сокращенно упоминаемой как "метод ОТ-ПЦР") с использованием в качестве матрицы фракции общей РНК или мРНК, полученной из клеток. Используя полученную геномную ДНК или кДНК в качестве матрицы, нуклеиновую кислоту, кодирующую каждый домен из: антигенсвязывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного сигнального домена, можно амплифицировать методом ПЦР с помощью синтетического праймера ДНК, состоящего из части нуклеотидной последовательности, кодирующей каждый домен, и нуклеотидной последовательности, кодирующей спейсер. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может быть получена путем повторения метода ПЦР с использованием полученных соответствующих доменов в качестве матриц и синтетических праймеров ДНК.

Настоящее изобретение также относится к вектору переноса гена химерного антигенного рецептора, содержащему нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению (далее упоминаемому как трансгенный вектор по настоящему изобретению).

Трансгенный вектор по настоящему изобретению может быть получен, например, путем связывания нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению ниже промотора в соответствующем векторе для переноса гена. Вектор для переноса гена, промотор и другие элементы могут быть такими же, как вектор, промотор и другие элементы, используемые при введении экзогенного TCR в плюрипотентные стволовые клетки в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также относится к клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, содержащей трансгенный вектор по настоящему изобретению (далее упоминаемой как клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению).

Клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению может быть получена путем введения трансгенного вектора по настоящему изобретению в клетки и культивирования этих клеток. В качестве клетки, в которую вводят трансгенный вектор по настоящему изобрете-

нию, можно упомянуть CD3-позитивную клетку или ее клетку-предшественницу (гемопоэтическую стволовую клетку, обычную лимфоидную клетку-предшественницу, лимфобласт и т.п.) или плюрипотентную стволовую клетку. В качестве плюрипотентной стволовой клетки можно упомянуть ES-клетку, iPS-клетку, EC-клетку и EG-клетку, при этом ES-клетка или iPS-клетка являются предпочтительными.

Трансгенный вектор по настоящему изобретению может быть введен в клетки такими способами, как липофекция, липосомный метод, микроинъекция и т.п.

Клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению предпочтительно является CD3-позитивной клеткой. CD3-позитивная клетка предпочтительно представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную клетку (CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-позитивную клетку или CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку), более предпочтительно CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку. Другой предпочтительной CD3-позитивной клеткой, упомянутой выше, является, например, CD3-позитивная CD4-позитивная клетка (CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-позитивная клетка или CD3-позитивная CD4-позитивная CD8-негативная клетка).

Когда клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению представляет собой клетку, полученную путем введения трансгенного вектора по настоящему изобретению в плюрипотентные стволовые клетки, плюрипотентная стволовая клетка может быть дифференцирована в CD3-позитивную клетку в соответствии с известным методом. Конкретный способ дифференцировки плюрипотентной стволовой клетки в CD3-позитивную клетку может быть таким же, как метод дифференцировки предназначенной для культивирования CD3-позитивной клетки в плюрипотентную стволовую клетку в способе продуцирования или способе экспансии в культуре по настоящему изобретению.

Полученной таким образом клетке, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению придают специфичность к представляющему интерес антигену через химерный антигенный рецептор, и она может проявлять цитотоксическую активность против опухолей, экспрессирующих представляющий интерес антиген. Химерный антигенный рецептор может распознавать непосредственно антигенную молекулу без участия HLA класса I или класса II. Таким образом, клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, может вызывать сильный иммунный ответ даже в отношении опухолей со сниженной экспрессией гена HLA класса I или класса II.

Следовательно, настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, содержащему в качестве активного ингредиента клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению (далее иногда упоминаемому как лекарственное средство по настоящему изобретению). Лекарственное средство, содержащее клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, можно использовать для профилактики или лечения опухолей, экспрессирующих антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению, и можно вводить, например, млекопитающим (например, (мышь, крысе, хомяку, кролику, кошке, собаке, крупному рогатому скоту, овце, обезьяне, человеку), предпочтительно человеку. Таким образом, в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения предлагается лекарственное средство по настоящему изобретению для применения для профилактики или лечения опухолей, экспрессирующих антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению. Кроме того, предлагается способ профилактики или лечения опухолей, экспрессирующих антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению, включая введение клетки по настоящему изобретению, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, предпочтительно в форме лекарственного средства, содержащего эту клетку.

Опухоль, которая может быть подвергнута профилактике или лечению с помощью клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению, не имеет особых ограничений при условии, что она экспрессирует антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению.

Опухоль описана, например, в "Daniel Baumhoer et al., Am. J. Clin. Pathol., 2008, 129, 899-906" и т.п. Опухоль включает доброкачественную опухоль, злокачественную опухоль (также называемую "раком") и опухоль, которая может быть диагностирована или определена как доброкачественная или злокачественная. Конкретные примеры опухолей включают, без ограничения, рак печени (например, гепатому), рак яичника (например, светлоклеточную аденокарциному яичника), рак в детском возрасте, рак легких (например, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого), рак яичка (например, несеминомную опухоль половых клеток), опухоль мягких тканей (например, липосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому), рак матки (например, интраэпителиальную опухоль шейки матки, плоскоклеточный рак шейки матки), меланому, опухоль надпочечников (например, аденому надпочечника) невротическую опухоль (например, шванному), рак желудка (например, аденокарциному желудка), рак почек (например, опухоль Гравитца), рак груди (например, инвазивную дольчатую карциному, рак слизистой), рак щитовидной железы (например, медуллярный рак), рак гортани (например, плоскоклеточную карциному), рак мочевого пузыря (например, инвазивную переходящую клеточную карциному) и т.п.

Клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению, может

быть культивирована и/или стимулирована с помощью подходящей среды и/или стимулирующей молекулы перед введением испытуемому. Примеры стимулирующей молекулы включают, без ограничения, цитокины, подходящий белок, другие компоненты и т.п. Примеры цитокинов включают IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IFN- $\beta$  и т.п., и предпочтительно можно использовать IL-2. Хотя концентрация IL-2 в среде не имеет особых ограничений, например, она составляет предпочтительно от 0,01 до  $1 \times 10^5$  Ед/мл, более предпочтительно от 1 до  $1 \times 10^4$  Ед/мл. Примеры подходящего белка включают антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором, лиганд CD3, лиганд CD28, анти-CD3 антитело, анти-CD30 антитело и анти-IL-4 антитело. Помимо этого, также может быть добавлен фактор, стимулирующий лимфоциты, такой как лектин и т.п. Кроме того, в среду можно добавить сыворотку или плазму. Хотя количество добавок в эти среды не имеет особых ограничений, можно упомянуть предел от 0 до 20 об.%. Кроме того, количество используемой сыворотки или плазмы может быть изменено в соответствии с этапом культивирования. Например, можно поэтапно снижать концентрацию в сыворотке или плазме. Происхождение сыворотки или плазмы может быть аутологичным или аллогенным, и аутологичное происхождение предпочтительно с точки зрения безопасности.

Лекарственное средство по настоящему изобретению предпочтительно используют путем парентерального введения испытуемому. Примеры способа парентерального введения включают внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, внутрибрюшинное и подкожное введение и т.п. Хотя дозу выбирают надлежащим образом в соответствии с состоянием, массой тела, возрастом и т.п. испытуемого, лекарственное средство обычно вводят таким образом, чтобы количество клеток, как правило, составляло от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$  клеток, предпочтительно от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  клеток, более предпочтительно от  $5 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  клеток на дозу для испытуемого с массой тела 60 кг. Т-клетки можно вводить однократно или несколькими порциями. Лекарственное средство по настоящему изобретению может быть приготовлено в виде известной лекарственной формы, подходящей для парентерального введения, например, в виде инъекции или агента для инъекций. Лекарственное средство по настоящему изобретению может содержать физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), среду и т.п. для поддержания клеток в стабильном состоянии. Среда не имеет особых ограничений, и ее примеры включают, без ограничения, такие среды, как RPMI, ALM-V, X-VIVO10 и т.п. Лекарственное средство может содержать фармацевтически приемлемый носитель (например, человеческий сывороточный альбумин), консервант и т.п. для стабилизации.

Кроме того, поскольку клетка, экспрессирующая химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению, может уничтожать клетки, экспрессирующие антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению, ее можно использовать в качестве агента уничтожения в отношении клеток, экспрессирующих этот антиген. Такой агент уничтожения можно получать и использовать таким же образом, как и лекарственное средство.

Настоящее изобретение также включает варианты осуществления, относящиеся к применению клетки, экспрессирующей химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению, в производстве профилактических или терапевтических противоопухолевых агентов, экспрессирующей антиген, распознаваемый химерным антигенным рецептором по настоящему изобретению, в соответствии с лекарственным средством, содержащим клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор, по настоящему изобретению. Профилактические или терапевтические противоопухолевые агенты могут быть получены известным способом. Например, они могут быть произведены в виде известной лекарственной формы, подходящей для парентерального введения, например в виде инъекции или агента для инъекций и т.п., как в вышеупомянутом способе приготовления лекарственного средства по настоящему изобретению.

Хотя настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на примеры, эти примеры приведены исключительно с целью иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение.

### Примеры

#### Пример 1.

##### 1. Приготовление iPS-клетки.

В качестве iPS-клетки использовали штамм Ff-I01s04, предоставленный Центром исследования и применения iPS-клеток (Center for iPS Cell Research and Application, CiRA) Киотского университета. Культивирование iPS-клеток выполняли в соответствии с протоколом, предоставляемым CiRA, "Культивирование человеческих iPS-клеток в среде без фидерных клеток".

##### 2. Введение гена Т-клеточного рецептора (TCR) в iPS-клетку.

В качестве гена TCR использовали ген, полученный из TAK1 HLA-A\*24:02-укороченного WT1-специфического гена TCR (WT1-TCR), предоставленного профессором Масатакой Ясукавой (Masataka Yasukawa) из Высшей школы медицины Университета Эхимэ (Graduate School of Medicine, Ehime University). Перенос гена в iPS-клетки осуществляли путем включения в лентивирусный вектор CS-UbC-RfA-IRES2-hKO1, поставляемый институтом физико-химических исследований, и инфицированием iPS-клеток.

##### 3. Дифференцировка iPS-клеток, содержащих введенный в них ген WT1-TCR, в CD8-позитивные

Т-клетки (CTL).

Дифференцировку iPS-клеток, содержащих введенный в них ген WT1-TCR, в CD8-позитивные Т-клетки (CTL) выполняли в соответствии с известным методом (WO 2017/221975). Клетки, полученные таким образом, были CD3-позитивными, CD8-позитивными. Далее эти клетки использовали как Т-клетки, происходящие из iPS-клеток.

#### 4. Реагент, антитело.

РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) приобретали у Takara Bio Inc. В качестве агонистического антитела к CD3 использовали очищенное функциональное человеческое анти-CD3 антитело (клон: ОКТ3), приобретенное у eBioscience, или анти-CD3 антитело (клон: UCНТ1), приобретенное у GeneТех. Если не указано иное, использовали ОКТ3. В качестве агонистического антитела к CD30 использовали агонистическое антитело к CD30, приобретенное в R&D systems.

5. Иммунизация агонистического антитела к CD3 и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) на культуральном планшете.

Агонистические антитела к CD3 и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак), растворенные в PBS до необходимых концентраций, добавляли в 96-луночный планшет в количестве 50 мкл/луночку и планшет оставляли на ночь при 4°C. Клетки промывали PBS и тестировали.

6. ELISA для детектирования иммобилизованного агонистического антитела к CD3 и иммобилизованного РетроНектин (зарегистрированный торговый знак).

Для детектирования иммобилизованного агонистического антитела к CD3 использовали HRP-конъюгированное козье антитело к мышиному IgG2a, содержащееся в наборе для количественного ELISA определения мышиного IgG2a, приобретенном в Bethyl Laboratories. Для детектирования иммобилизованного РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) использовали меченные пероксидазой антитела к РетроНектину, содержащиеся в наборе RetroNectin EIA, приобретенном у Takara Bio Inc. Каждое идентифицирующее антитело добавляли в иммобилизованный планшет, планшет оставляли на 1 ч при комнатной температуре. После промывки PBS, содержащим 0,05% Твин-20, добавляли раствор субстрата 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (ThermoFisher). После выдерживания в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 1 М серную кислоту для прекращения реакции и измеряли оптическую плотность при 450 нм с помощью планшетного ридера.

#### 7. Тест на пролиферацию.

Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, приготовленные с плотностью 100000 клеток/200 мкл в среде, полученной путем добавления цитокина и т.п. (см. табл. 1) к среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 15% FBS, высевали в планшет с иммобилизованным на нем агонистическим антителом к CD3 (3, 30, 300, 3000 нг/мл) и РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) (0, 1,85, 2,25, 16,7, 50, 150 мкг/мл) и культивировали в течение 3 дней при 5% CO<sub>2</sub>/37°C.

На 3-й день культивирования клетки собирали с планшета и с помощью TC20 (Bio-Rad) измеряли их количество. Клетки суспендировали в соответствующем количестве среды, полученной путем добавления цитокинов и т.п., указанных в табл. 2, в среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 15% FBS, добавляли в неиммобилизованный 96-луночный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого клетки собирали с планшета в любой из дней 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 и 16 по одному разу в каждый момент времени и в общей сложности от 4 до 7 раз и измеряли количество клеток. Клетки суспендировали в соответствующем количестве, добавляли в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C.

Таблица 1

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация
ITS (100x) (Добавки инсулин-трансферрин-селен)	Invitrogen	1x
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл
IL-7	Peprotech	10 нг/мл
IL-15	Peprotech	10 нг/мл
IL-2	Peprotech	10 нг/мл
IL-21	Peprotech	20 нг/мл
IL-12	Merck	50 нг/мл
IL-18	MBL	50 нг/мл
Z-VAD-FMK	R&D	10 мкМ

Таблица 2

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация
ITS (100x) (Добавки инсулин-трансферрин-селен)	Invitrogen	1x
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл
IL-7	Peptotech	10 нг/мл
IL-15	Peptotech	10 нг/мл

## 8. Тест АТФ.

В день 12 культивирования выполняли измерение клеток для оценки уровня пролиферации и АТФ в культуральном супернатанте в соответствии со стандартным протоколом и с помощью набора CellTiter-Glo® для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток, приобретенного у Promega КК.

## 9. Измерение WT1 антигенспецифической цитотоксической активности.

HLA-A\*24:02-позитивные клетки LCL приобретали в Центре RIKEN BioResource.

Клетки культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% FBS. Синтез антигенного пептида WT1 (CMTWNQMNL: SEQ ID NO: 3) передавали на аутсорсинг в Scrum Inc. Результаты теста на цитотоксичность оценивали согласно стандартному протоколу и с помощью набора DELFIA для иммуноанализа, приобретенного у Perkin Elmer Inc.

## 10. Тест на пролиферацию с добавлением агонистического антитела к CD30.

Агонистическое антитело к CD30, разведенное до конечной концентрации 0, 30, 100, 300 нг/мл, добавляли в культуральную среду во время суспендирования клеток. В остальном все процедуры аналогичны процедурам, используемым в методе "7. Тест на пролиферацию".

В тесте на пролиферацию происходящих из iPS-производных Т-клеток в результате многократной стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30, где агонистическое антитело к CD30 разбавляли до конечной концентрации 100 нг/мл, добавляли в культуральную среду во время суспендирования клеток. В остальном все процедуры были аналогичны процедурам, используемым в методе "7. Тест на пролиферацию".

## 11. Детектирование CD197 и CD45RA на поверхности клеточной мембраны.

В день 7 культивирования клетки собирали, окрашивали антителом из табл. 3 и детектировали методом проточной цитометрии с помощью LSRFortessa™ X-20 (BD Bioscience).

Таблица 3

Мишень	Флуоресцентное вещество	Клон	Поставщик
CD5	APC/Cy7	UCHT2	BioLegend
CD8a	PerCP/Cy5.5	SK1	BioLegend
CD8b	PE/Cy7	SID18BEE	eBioscience
CD197	AF647	G043H7	BioLegend
CD45RA	FITC	HI100	BioLegend

## Экспериментальный пример 1.

1. Измерение концентрации агонистического антитела к CD3 и концентрации РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), подходящей для иммобилизации на культуральном планшете.

Концентрацию агонистического антитела к CD3 и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), подходящую для иммобилизации на культуральном планшете, измеряли методом ELISA (фиг. 1). Было показано, что зависящая от иммобилизации концентрация агонистического антитела к CD3 находится в диапазоне от 3 до 3000 нг/мл. Было показано, что зависящая от концентрации иммобилизация РетроНектина (зарегистрированный торговый знак) находится в диапазоне от 16,7 до 150 мкг/мл.

2. Проверка диапазона концентраций агонистического антитела к CD3 и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), необходимого для иммобилизованного агонистического антитела к CD3 и иммобилизованного РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), подходящих для пролиферации iPS-производных Т-клеток.

Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, стимулировали в течение 3 дней на планшете с иммобилизованными агонистическим антителом к CD3 (0, 3, 30, 300, 3000 нг/мл) и РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) (0, 1,85, 5,56, 16,7, 50, 150 мкг/мл) и культивировали на неиммобилизованном планшете в течение 9 дней, затем измеряли количество АТФ (фиг. 2).

3. Тест на пролиферацию Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак)

Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, приготовленные из расчета 100000 клеток/200 мкл, стимулировали в течение 3 дней на 96-луночном планшете с иммобилизованными на нем агонистическим антителом к CD3 (3000 нг/мл) и РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) (150 мкг/мл), или с анти-CD3/CD28 гранулами (Dynabeads), причем соотношение количества Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, и количества гранул составляло 1:1, и с течением времени измеряли количество клеток, куль-

тивируемых без стимуляции. (фиг. 3). При стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) уровень пролиферации Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, был выше, чем в случае с анти-CD3/CD28 гранулами.

4. Тест на пролиферацию Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, многократно стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

Подтверждали реакцию пролиферации Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, на многократную стимуляцию иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак). Один из тестов на пролиферацию выполняли путем стимуляции Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, в течение 3 дней на иммобилизованном планшете и культивирования клеток в течение 11-15 дней на неиммобилизованном планшете. После завершения теста регулировали количество клеток и подвергали следующему тесту. Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, отвечали на четвертую стимуляцию иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и пролиферировали (фиг. 4).

5. Проверка антигенспецифической цитотоксической активности iPS-производных Т-клеток, несущих ген WT1-TCR, пролиферирующих при стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак)

Оценивали антигенспецифическую цитотоксическую активность iPS-производных Т-клеток, несущих ген WT1-TCR, пролиферирующих в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак). WT1 антигенспецифическую цитотоксическую активность оценивали по разнице между цитотоксичностью к LCL, добавленному с антигенным пептидом WT1, и цитотоксичностью к LCL без его добавления. iPS-производные Т-клетки, несущие ген WT1-TCR, почти не обладали неспецифической цитотоксической активностью и демонстрировали только WT1 антигенспецифическую цитотоксическую активность (фиг. 5).

6. Тест на пролиферацию Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, в результате стимуляции агонистическим антителом к CD30

Проверяли, влияет ли добавление агонистического антитела к CD30 (0, 30, 100, 300 нг/мл) во время стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) на пролиферацию Т-клеток, происходящих из iPS-клеток. В качестве иммобилизованного 96-луночного планшета использовали планшет, на котором были иммобилизованы агонистическое антитело к CD3 (3000 нг/мл) и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) (150 мкг/мл). При добавлении агонистического антитела к CD30 наблюдали усиление пролиферации Т-клеток, происходящих из iPS-клеток. Клетки пролиферировали в зависимости от концентрации агонистических антител к CD30 (фиг. 6).

7. Тест на пролиферацию Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, в результате многократной стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

Проверяли, демонстрируют ли Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, реакцию в виде пролиферации при многократной стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30. Клетки высевали в планшет, содержащий иммобилизованные на нем анти-CD3 антитело (3000 нг/мл) и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) (150 мкг/мл), и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C в течение 3 дней.

На 3-й день культивирования клетки собирали с планшета и их количество измеряли с помощью TC20 (Bio-Rad). Клетки суспендировали в подходящем количестве среды, полученной путем добавления цитокинов и т.п., указанных в табл. 2, к среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 15% FBS, добавляли в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого клетки собирали с планшета по одному разу в дни 6, 7, 9, 10, 14 и 16 и измеряли количество клеток. Клетки суспендировали в соответствующем количестве, добавляли в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. В качестве культуральной среды использовали среду, в которую добавляли агонистическое антитело к CD30, разбавленное до конечной концентрации 100 нг/мл, и среду, не содержащую агонистическое антитело к CD30. Вышеупомянутую стимуляцию с 0 по 16 день культивирования повторяли дважды. Даже при второй стимуляции Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, пролиферировали в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30 по сравнению со стимуляцией только иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) (фиг. 7).

8. Детектирование CD197 и CD45RA на поверхности мембраны Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30.

После стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) или стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к

CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30, в день 7 измеряли экспрессию CD197 и CD45RA на поверхности мембраны Т-клеток, происходящих из iPS-клеток, с помощью проточного цитометра. В клеточной популяции, стимулированной агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30, преобладали CD197-позитивные CD45RA-негативные Т-клетки, аналогичные Т-клеткам центральной памяти, происходящим из iPS-клеток (фиг. 8).

9. Проверка WT1 антигенспецифической цитотоксической активности iPS-производных Т-клеток, несущих ген WT1-TCR, пролиферирующих при стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином и агонистическим антителом к CD30 iPS-производные Т-клетки, несущие ген WT1-TCR, пролиферирующие в результате стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином и агонистическим антителом к CD30, наносили на HLA-A\*24:02-позитивные клетки LCL в присутствии или в отсутствие WT1 антигенного пептида и оценивали WT1 антигенспецифическую цитотоксическую активность. iPS-производные Т-клетки, несущие ген WT1-TCR, практически не имели неспецифической цитотоксической активности и демонстрировали только WT1 антигенспецифическую цитотоксическую активность (фиг. 9).

#### Пример 2.

1. Получение CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека Периферическая кровь человека представляла собой мононуклеарные клетки периферической крови здоровых доноров, полученные от Precision Bioservices. Используя набор для выделения человеческих CD8+ Т-клеток, (Milteny) выделяли CD8-позитивные Т-клетки.

2. Тест на пролиферацию человеческих CD8-позитивных Т-лимфоцитов.

Тест на пролиферацию выполняли методом, аналогичным описанному в пункте 7 Примера 1.

3. Культура CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека, используемая в тесте на приживление у мышей.

К CD8-позитивным Т-клеткам периферической крови человека, суспендированным с конечной концентрацией 100000 клеток/мл в трех видах сред, полученных путем добавления приведенных в табл. 4 добавок к среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 15% FBS, добавляли Т-активатор CD3/CD28 Dynabeads (gibco) в количестве, соответствующем 3-кратному количеству клеток, и клетки культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C в течение 3 дней. Клетки собирали с планшета на 3-й день культивирования и суспендировали в соответствующем количестве среды, полученной путем добавления цитокинов и т.п., приведенных в табл. 5, в среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 15% FBS, и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого, на 10 день культивирования клетки собирали с планшета и измеряли их количество. Клетки суспендировали в соответствующем количестве и вводили мышам. В дни 6, 10, 13, 17 культивирования клетки собирали с планшета, суспендировали в соответствующем количестве и использовали в экспериментах по оценке экспрессии CD197.

Таблица 4

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация	w IL2	w IL7/IL15	w IL7/IL15/анти-CD30Ab
Добавки инсулин-трансферрин-селен	Invitrogen	1x	+	+	+
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл	+	+	+
IL-2	Peprotech	15 нг/мл	+		
IL-7	Peprotech	10 нг/мл		+	+
IL-15	Peprotech	10 нг/мл		+	+
IL-21	Peprotech	20 нг/мл		+	+
IL-12	Merck	50 нг/мл		+	+
IL-18	MBL	50 нг/мл		+	+
TL-1A	Peprotech	50 нг/мл		+	+
Z-VAD-FMK	R&D	10 мкМ		+	+
человеческое анти-CD30 антитело	R&D	300 нг/мл			+

w: с (добавки, добавленные в каждую группу, показаны знаком +).

Таблица 5

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация	w IL2	w IL7/IL15	w IL7/IL15/анти-CD30Ab
Добавки инсулин-трансферрин-селен	Invitrogen	1x	+	+	+
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл	+	+	+
IL-2	Peptotech	15 нг/мл	+		
IL-7	Peptotech	10 нг/мл		+	+
IL-15	Peptotech	10 нг/мл		+	+
человеческое анти-CD30 антитело	R&D	300 нг/мл			+

w: с (добавки, добавленные в каждую группу, показаны знаком +).

4. Введение CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, мышам и извлечение прижившихся клеток.

Использовали самцов мышей NSG в возрасте 8 недель (Japan Charles River), которых перед введением клеток в тот же день облучали в дозе 2 Гр гамма-лучами. 5000000 клеток, отобранных из культуры CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, использованных в тесте на приживание у мышей, описанном в пункте 3 Примера 2, вводили мышам внутривенно, и мышей содержали в течение 4 недель. После этого мышей подвергали эвтаназии, и собирали клетки костного мозга, спленоциты и лейкоциты в крови.

5. Детектирование CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека, приживленных в ткани мыши.

Собранные клетки окрашивали антителом, представленным в табл. 3, и детектировали методом проточной цитометрии с помощью LSRFortessa™ X-20 (BD Bioscience).

Экспериментальный пример 2.

1. Тест на пролиферацию CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека в результате стимуляции агонистическим антителом к CD30.

Подтверждали, влияет ли добавление агонистического антитела к CD30 во время стимуляции иммунизованными антителом к CD3/ПетроНектином (зарегистрированный торговый знак) на пролиферацию CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека. Добавление агонистического антитела к CD30 способствовало пролиферации CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека (фиг. 10).

2. Детектирование CD197 на поверхности мембраны CD8-позитивных Т-клеток периферической крови человека после стимуляции анти-CD3/CD28 гранулами и агонистическим антителом к CD30.

Экспрессию CD197 на поверхности клеточной мембраны CD8-позитивных Т-клеток, полученных из периферической крови человека, стимулированных анти-CD3/CD28 гранулами в среде, содержащей IL-2, среде, содержащей IL-7/IL-15, или среде, содержащей LL-7/IL-15/анти-CD30 антитело, измеряли в дни 6, 10, 13, 17 культивирования с помощью проточного цитометра. В день 6 экспрессию CD197 подтверждали во всех группах. Однако экспрессия CD197 практически исчезла в день 13 в группе со средой, содержащей IL-2, и в день 17 в группе со средой, содержащей LL-7/IL-15, тогда как в группе со средой, содержащей IL-7/IL-15/анти-CD30 антитело, экспрессия CD197 сохранилась даже в день 17 (фиг. 11).

3. Оценка приживания CD8-позитивных Т-клеток, происходящих из периферической крови человека, после стимуляции анти-CD3/CD28 гранулами и агонистическим антителом к CD30.

В день 10 культивирования CD8-позитивные Т-клетки, полученные из периферической крови человека, стимулированные анти-CD3/CD28 гранулами в среде, содержащей LL-2, или в среде, содержащей LL-7/IL-15, или в среде, содержащей IL-7/IL-15/анти-CD30 антитело, вводили внутривенно иммунодефицитным мышам и подтверждали приживание в крови и иммунных тканях. В день 28 после введения у мышей собирали кровь, селезенку и костный мозг, и определяли содержание в них CD8-позитивных Т-клеток человека методом проточной цитометрии. В группе со средой, содержащей IL-2, CD8-позитивные Т-клетки человека практически не наблюдали ни в одном из органов, тогда как в группе со средой, содержащей IL-7/IL-15, и в группе со средой, содержащей IL7/IL-15/анти-CD30 антитело, CD8-позитивные Т-клетки человека были обнаружены. Более высокое содержание CD8-позитивных Т-клеток человека наблюдали в группе со средой, содержащей LL-7/IL-15/анти-CD30 антитело. Таким образом, было показано, что CD8-позитивные Т-клетки периферической крови человека, культивируемые в среде, содержащей LL-7/IL-15/анти-CD30 антитело, могут не только поддерживать экспрессию CD197 в течение длительного времени во время культивирования, но также могут выживать *in vivo* в

течение длительного времени (фиг. 12).

Пример 3.

1. Тест на пролиферацию анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток.

Анти-CD19-CART клетки, происходящие из iPS-клеток, приготовленные с плотностью до 100000 клеток/200 мкл в среде, полученной путем добавления цитокина и т.п. из табл. 1 к среде  $\alpha$ -MEM, содержащей 15% FBS, высевали в планшет, содержащий анти-CD3-антитело, и на нем иммобилизовали РетроНектин, затем планшет культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C в течение 3 дней. Клетки собирали с планшета на 3 день культивирования, и количество клеток измеряли с помощью TC20 (Bio-Rad). Клетки суспендировали в соответствующем количестве среды, полученной путем добавления цитокинов и т.п., показанных в табл. 2, в среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 15% FBS, добавляли в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого клетки собирали с планшета от 4 до 7 раз в любой из дней 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16 культивирования и измеряли количество клеток. Клетки суспендировали в соответствующем количестве, добавляли в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C.

2. Ген анти-CD19-CAR.

В качестве гена анти-CD19-CAR искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 5), предназначенный для выравнивания в порядке, показанном в табл. 6, от N-конца.

Таблица 6

В направлении от N-конца	Ген	Количество аминокислот
1	Ведущая последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина	22
2	Варибельная область легкой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	104
3	Линкер GGGGS	15
4	Варибельная область тяжелой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	120
5	Последовательность, полученная из CD8 (включая трансмембранную область)	83
6	Область внутриклеточного домена CD28	41
7	Область внутриклеточного домена 4-1BB	47
8	Область внутриклеточного домена CD3 $\zeta$	112

3. Получение ретровирусного вектора, несущего ген анти-CD19-CAR.

Искусственную олиго ДНК, синтезированную, как описано в пункте 2 Примера 3, включали в участок мультиклонирования ретровирусного вектора рMEG5. Получение вирусного вектора осуществляли в Unitech.

4. Получение анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток.

iPS-производные Т-клетки, полученные, как описано в пункте 3 Примера 1, инфицировали ретровирусным вектором, несущим ген анти-CD19-CAR, и продуцировали, как описано в пункте 3 Примера 3, таким образом получая происходящие из iPS-клеток анти-CD19-CART клетки.

Экспериментальный пример 3.

1. Тест на пролиферацию iPS-производных анти-CD19-CART клеток, стимулированных иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

iPS-производные Т-клетки, полученные, как описано в пункте 3 Примера 1, и происходящие из iPS-клеток анти-CD19-CART клетки, полученные, как описано в пункте 4 Примера 3, стимулировали в течение 3 дней иммобилизованными анти-CD3-антителом/РетроНектином (зарегистрированный товарный знак) и количество клеток, культивируемых без стимуляции, измеряли с течением времени. При стимуляции иммобилизованными анти-CD3-антителом/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) клетки анти-CD19-CART, происходящие из iPS-клеток, пролиферировали до того же уровня, что и Т-клетки, происходящие из iPS-клеток (фиг. 13).

2. Тест на пролиферацию анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток, в результате стимуляции агонистическим антителом к CD30.

Подтверждали, влияет ли добавление агонистического антитела к CD30 во время стимуляции иммобилизованными антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) на пролиферацию анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток. Добавление агонистического антитела к CD30 способствовало пролиферации анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток (фиг. 14).

3. Детектирование CD197 на поверхности мембраны анти-CD19-CART клеток, происходящих из iPS-клеток, после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30

Экспрессия CD197 на поверхности клеточной мембраны анти-CD19-CART клеток, происходящих

из iPS-клеток, в дни 3 и 7 после стимуляции иммобилизованными анти-CD3 антителом/РетроНектином (зарегистрированный товарный знак) или после стимуляции иммобилизованными анти-CD3 антителом/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак)/агонистическим антителом к CD30 измеряли с помощью проточного цитометра. Экспрессию CD197 в день 3 подтверждали в обеих группах. Однако экспрессия CD197 практически исчезла в день 7 в группе стимуляции анти-CD3 антителом/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак). Однако было показано, что в группе стимуляции анти-CD3 антителом/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) + агонистическим антителом к CD30, экспрессия CD197 сохранилась (фиг. 15).

4. Проверка цитотоксической активности к клеткам Raji у анти-CD19-CART, происходящих из iPS-клеток, после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30

Цитотоксическую активность iPS-производных анти-CD19-CART клеток, полученных в результате пролиферации, описанной в пункте 1 [экспериментальный пример 3], к CD19-позитивным раковым клеткам оценивали по цитотоксической активности к CD19-позитивным клеткам Raji. Анти-CD19-CART клетки, происходящие из iPS-клеток, проявляли цитотоксическую активность к CD19-экспрессирующим клеткам Raji (фиг. 16).

Пример 4.

1. Ген анти-CD19-CAR, содержащий внутриклеточный домен CD30.

В качестве гена анти-CD19-CAR искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 7), предназначенный для выравнивания в порядке, показанном в табл. 7, от N-конца.

Таблица 7

Порядок от N-конца	Ген	Количество аминокислот
1	Ведущая последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина	22
2	Варибельная область легкой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	104
3	Линкер GGGGS	15
4	Варибельная область тяжелой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	120
5	Последовательность, полученная из CD8 (включая трансмембранную область)	83
6	Область внутриклеточного домена CD28	41
7	Область внутриклеточного домена CD30 (SEQ ID NO: 6)	87
8	Область внутриклеточного домена CD3 $\zeta$	112

2. Получение ретровирусного вектора, несущего ген анти-CD19-CAR, содержащий внутриклеточный домен CD30.

Искусственную олиго-ДНК, синтезированную, как описано в пункте 1 Примера 4, включали в участок мультиклонирования в ретровирусном векторе рMY. Вирусный вектор получали, используя клетки FLYRD18 для получения ретровирусного вектора.

3. Получение iPS-производных анти-CD19-CART клеток (iCD19-CD30-CART), содержащих внутриклеточный домен CD30.

T-клетки, происходящие из iPS-клеток, полученные, как описано в пункте 3 Примера 1, инфицировали ретровирусным вектором, несущим ген анти-CD19-CAR, и продуцировали, как описано в пункте 2 Примера 4, в результате чего получали анти-CD19-CART клетки, происходящие из iPS-клеток (iCD19-CD30-CART), содержащие внутриклеточный домен, происходящий из CD30.

Экспериментальный пример 4.

Цитотоксическую активность iCD19-CD30-CART, полученных, как описано в пункте 3 Примера 4, к CD19-позитивным раковым клеткам оценивали по цитотоксической активности к CD19-позитивным клеткам Raji. ICD19-CD30-CART проявляли цитотоксическую активность к CD19-экспрессирующим клеткам Raji (фиг. 17).

Пример 5.

1. Получение iPS-клетки.

Аналогично Примеру 1, в качестве iPS-клетки использовали штамм Ff-I01s04, предоставленный Центром исследования и применения iPS-клеток (CiRA) Университета Киото. Культивирование iPS-клеток осуществляли в соответствии с протоколом, предоставленным CiRA, "Культивирование человеческих iPS-клеток в условиях без фидерных клеток".

2. Дифференцировка iPS-клеток в  $\gamma$ 5TCR-позитивные T-клетки ( $\gamma$  $\delta$ T-клетки).

Дифференцировку iPS-клеток в  $\gamma$ 5TCR-позитивные T-клетки ( $\gamma$  $\delta$ T-клетки) выполняли в соответствии с известным методом (WO 2017/221975), как описано в Примере 1. В качестве анти-CD3 антитела, используемого на этапе дифференцировки, использовали 3000 нг/мл UCHL1 (производства GeneTex). Полученные CD3-позитивные клетки представляли собой  $\gamma$  $\delta$ T-клетки (далее упоминаемые как

" $\gamma\delta$ T-клетки, происходящие из iPS-клеток ( $i\gamma\delta$ T-клетки)").

### 3. Экспансия iPS-производных $\gamma\delta$ T-клеток в культуре.

$i\gamma\delta$ T-клетки, полученные, как описано в пункте 2 Примера 5, суспендировали с плотностью 2000000 клеток/мл в среде, полученной добавлением цитокина, показанного в табл. 8, в среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 15% FBS, и суспензию высевали в планшет, содержащий иммобилизованные на нем анти-CD3 антитело (UCHT1) и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак), и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C в течение 3 дней. Клетки собирали с планшета в день 3 культивирования и измеряли количество клеток с помощью NucleoCounter NC-200 (ChemoMetec). Клетки суспендировали в соответствующем количестве среды, полученной путем добавления цитокинов и т.п., показанных в табл. 9, в среду  $\alpha$ -MEM, содержащую 15% FBS, добавляли в неиммобилизованный 6-луночный планшет G-Rex (WILSONWOLF) и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого часть клеток собирали с планшета 4-6 раз в любой из дней 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 17 культивирования и измеряли количество клеток. Клетки иммобилизовали на культуральном планшете с анти-CD3 антителом и РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) следующим способом: анти-CD3 антитело (UCHT1, конечная концентрация 3000 нг/мл) и РетроНектин (конечная концентрация 150 мкг/мл), растворенные в PBS в необходимых концентрациях, добавляли в планшет и планшет оставляли на ночь при 4°C. Планшет промывали PBS и тестировали.

Таблица 8

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация	w/ анти-CD30 Ab	w/o анти-CD30 Ab
Добавки инсулин-трансферрин-селен	Invitrogen	1x	+	+
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл	+	+
IL-2	Peptotech	15 нг/мл	+	+
IL-7	Peptotech	10 нг/мл	+	+
IL-15	Peptotech	10 нг/мл	+	+
IL-21	Peptotech	20 нг/мл	+	+
IL-12	Merck	50 нг/мл	+	+
IL-18	MBL	50 нг/мл	+	+
TL-1A	Peptotech	50 нг/мл	+	+
Z-VAD-FMK	R&D	10 мкМ	+	+
Человеческое анти-CD30 антитело	R&D	300 нг/мл		+

w/: с, w/o: без. добавки, добавленной к каждой группе, показано знаком "+".

Таблица 9

Наименование продукта	Производитель	Конечная концентрация	w/ анти-CD30 Ab	w/o анти-CD30 Ab
Добавки инсулин-трансферрин-селен	Invitrogen	1x	+	+
Аскорбиновая кислота 2-фосфат	Sigma	50 мкг/мл	+	+
IL-2	Peptotech	15 нг/мл	+	+
IL-7	Peptotech	10 нг/мл	+	+
IL-15	Peptotech	10 нг/мл	+	+
Человеческое анти-CD30 антитело	R&D	300 нг/мл	+	+

w/: с, w/o без добавки, добавленные к каждой группе показаны знаком "+".

### 4. Экспериментальный пример 5.

1. Тест на пролиферацию  $\gamma\delta$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток, в результате стимуляции агонистическим антителом к CD30.

Проверяли, влияет ли добавление агонистического антитела к CD30 (300 нг/мл) в способе стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак), как описано в пункте 3 Примера 5, на пролиферацию  $\gamma\delta$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток. Т-клетки, происходящие из iPS-клеток, пролиферировали при добавлении агонистического антитела к CD30(фиг. 18).

Пример 6.

1. Ген IL-15R $\alpha$ /IL-15.

В качестве гена IL-15R $\alpha$ /IL-15 искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 8), предназначенный для выравнивания в порядке, показанном в табл. 10, от N-конца.

Таблица 10

Порядок от N-конца	Ген	Количество аминокислот
1	Лидирующая последовательность человеческого IL-2	23
2	С-терминальная последовательность человеческого IL-15	114
3	Линкер GGGGS	24
4	С-терминальная последовательность человеческого IL-15RA	239

2. Получение ретровирусного вектора, несущего ген IL-15R $\alpha$ /IL-15.

Искусственную олиго-ДНК, синтезированную, как описано в п.1 Пример 6, включали в участок мультиклонирования в ретровирусном векторе рMY. Вирусный вектор получали, используя клетки FLYRD18 для получения ретровирусного вектора.

3. Получение анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток, происходящих из iPS-клеток.

$\gamma$  $\delta$ T-клетки, происходящие из iPS-клеток (клетки i $\gamma$  $\delta$ T), полученные, как описано в пункте 2 Примера 5, инфицировали ретровирусным вектором, несущим ген анти-CD19-CAR и продуцированным, как описано в пункте 3 Примера 3, и ретровирусным вектором, несущим ген IL-15R $\alpha$ /IL-15, полученным, как описано в пункте 1 Примера 6, таким образом получая iPS-производные анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клетки (iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клетки).

4. Экспансия анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток, в культуре.

Методом, аналогичным методу, описанному в пункте 3 Пример 5, осуществляли культивирование iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток, за исключением того, что не добавляли IL-2.

Экспериментальный пример 6.

1. Тест на пролиферацию анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток, происходящих из iPS-клеток, в результате стимуляции агонистическим антителом к CD30.

Влияние добавления агонистического антитела к CD30 (0, 30, 100, 300 нг/мл) во время стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) на пролиферацию iCD19CAR/IL 15 $\gamma$  $\delta$ T клеток определяли, как описано в пункте 4 Примера 6. При добавлении агонистического антитела к CD30 пролиферация клеток усиливалась (фиг. 19).

2. Изучение цитотоксической активности анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток, после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) и агонистическим антителом к CD30

Оценивали цитотоксическую активность iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клеток, полученных, как описано в пункте 4 Примера 6. Используя CD19-позитивную клетку Raji и CD 19-негативную клетку CCRF-CEN в качестве клеток-мишеней, iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клетки смешивали в 0,5:1, 1:1, 2:1, 4:1, 8:1 и 16:1 с клетками-мишенями. Цитотоксическую активность iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток оценивали по уровню гибели клеток-мишеней через 2 ч. Было показано, что в случае экспансии iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клеток, культивируемых в среде, содержащей агонистическое антитело к CD30, они обладают цитотоксической активностью к CD19-позитивным клеткам Raji, но не демонстрируют цитотоксическую активность к CD19-негативным клеткам CCRF-CEN (фиг. 20).

3. Влияние на увеличение количества дней выживания анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток, происходящих из iPS-клеток, после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный товарный знак) и агонистическим антителом к CD30.

45 $\times$ 10<sup>5</sup> клеток Nalm6 (ATCC) трансплантировали мышам NOD/Shi-scid, IL-2 $\gamma$ KO (NOG) (Центральный институт экспериментальных животных, самки, возраст 7-8 недель) в хвостовую вену для получения мышей с ксенотрансплантатом Nalm6. В день 4 после трансплантации суспензию iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T-клеток (5 $\times$ 10<sup>6</sup> (клеток)), полученных, как описано в пункте 4 Примера 6, в 0,1 мл HBSS-буфере или равном количестве HBSS-буфера, вводили в хвостовую вену, и определяли количество дней выживания. Все мыши в контрольной группе введения, которым трансплантировали CD19-позитивные раковые клетки Nalm6 в хвостовую вену, погибли в течение 3 недель, тогда как все мыши в группе введения iCD19CAR/IL-15 $\gamma$  $\delta$ T клеток, культивированных в среде, содержащей агонистическое антитело к CD30, оставались живыми в течение не менее 6 недель (фиг. 21).

## Пример 7.

1. Получение анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток.

Анти-CD19-CAR клетки, происходящие из iPS-клеток, полученные способом, описанным в пункте 4 Примера 3, инфицировали ретровирусным вектором, несущим IL15R $\alpha$ /IL-15 ген, полученный, как описано в пункте 2 Примера 6, для получения анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток (iCD19CAR/IL-15 $\alpha$ T-клетки).

2. Экспансия в культуре iCD19CAR/IL-15 $\delta$ T-клеток с использованием иммобилизованных агонистического антитела к CD3/РетроНектина (зарегистрированный торговый знак).

iCD19CAR/IL-15 $\alpha$ T-клетки, полученные, как описано в пункте 1 Примера 7, культивировали способом, аналогичным способу, описанному в пункте 4 Примера 6, до дня 7. Человеческое анти-CD30 антитело не добавляли.

Экспериментальный пример 7.

1. Противоопухолевый эффект *in vivo* iCD19CAR/IL-15 $\alpha$ T-клеток после стимуляции иммобилизованными агонистическим антителом к CD3/РетроНектином (зарегистрированный торговый знак).

$5 \times 10^5$  экспрессирующих люциферазу клеток Nalm6 (ATCC) трансплантировали мышам NOD/Shi-scid, IL-2R $\gamma$ KO (NOG) (Центральный институт экспериментальных животных, самки, 7-8 недель) в хвостовую вену для получения мышей с ксенотрансплантатом Nalm6, экспрессирующими люциферазу. На 4-й день после трансплантации в хвостовую вену вводили суспензию iCD19CAR/IL-15 $\alpha$ T-клеток ( $5 \times 10^6 \times 10^6$  клеток), полученных, как описано в пункте 2 Примера 7, в 0,1 мл HBSS-буфере или равном количестве HBSS-буфера. Люциферин вводили в хвостовую вену каждую неделю после введения, и активность люциферазы, экспрессируемой клетками Nalm6, измеряли с помощью IVIS. В контрольной группе люминесценцию, испускаемую клетками Nalm6, подтверждали во всем теле через 2 недели после введения, и все мыши погибли через 3 недели после введения, тогда как в группе введения iCD19CAR/IL-15 $\alpha$ T-клеток люминесценция не обнаруживалась в течение 6 недель после введения (фиг. 22).

## Пример 8.

1. Получение  $\gamma$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток.

iPS-производные  $\gamma$ T-клетки (i $\gamma$ T-клетки) получали таким же образом, как описано в пунктах 1 и 2 Примера 5.

Экспериментальный пример 8.

1. Измерение концентрации агонистического антитела к CD3 (UCHT1), подходящего для иммобилизации на культуральном планшете, и концентрации РетроНектина (зарегистрированный торговый знак).

Агонистическое антитело к CD3 (UCHT1) и РетроНектин (зарегистрированный торговый знак) смешивали и иммобилизовали на культуральном планшете таким же образом, как описано в пункте 5 Примера 1. После этого их количество, иммобилизованное на культуральном планшете, измеряли методом ИФА (фиг. 23). Зависимую от концентрации иммобилизацию агонистического антитела к CD3 без смешивания с РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) подтверждали в диапазоне от 3 до 3000 нг/мл (от 0,003 до 30 мкг/мл). Однако количество иммобилизованного агонистического антитела к CD3 уменьшалось по мере того, как повышалась концентрация смешиваемого с ним РетроНектина (зарегистрированный торговый знак). С другой стороны, зависимую от концентрации иммобилизацию РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), подтверждали в пределах от 16,7 до 150 мкг/мл.

2. Проверка необходимого для иммобилизованных агонистического антитела к CD3 и иммобилизованного РетроНектина (зарегистрированный торговый знак) диапазона концентраций агонистического антитела к CD3 и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак), подходящих для пролиферации i $\gamma$ T-клеток, происходящих из iPS-клеток

i $\gamma$ T-клетки с плотностью 100000 клеток/200 мкл в среде, полученной путем добавления цитокина и т.п. из табл. 1 и агонистического антитела к CD30, разведенного до конечной концентрации 0, 3, 30, 300 нг/мл в среде IMDM, содержащей 15% FBS, высевали в планшет с агонистическим антителом к CD3 (0, 300, 3000, 30000 нг/мл (0, 0,3, 3, 30 мкг/мл)) и РетроНектином (зарегистрированный торговый знак) (0, 2, 15, 150 мкг/мл), иммобилизовали на нем и культивировали в течение 3 дней при 5% CO<sub>2</sub>/37°C.

На 3-й день культивирования клетки собирали с планшета, суспендировали в соответствующем количестве среды, полученной путем добавления цитокина и т.п. из табл. 2 в среду IMDM, содержащую 15% FBS, высевали в неиммобилизованный 96-луночный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. После этого клетки собирали с планшета в любой из дней 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 12 по одному разу в каждый период времени и в общей сложности от 4 до 7 раз, суспендировали в соответствующем количестве среды, высевали в неиммобилизованный планшет и культивировали при 5% CO<sub>2</sub>/37°C. В день 13 культивирования клетки подсчитывали с помощью гемоцитометра и измеряли скорость пролиферации относительно их количества в день 0 культивирования (фиг. 24). Эквивалентную индукцию пролиферации i $\gamma$ T-клеток наблюдали в планшетах, на которых иммобилизовали смесь агонистического антитела к

CD3 и РетроНектина (зарегистрированный торговый знак) при 0,3 и 2 мкг/мл, 3 и 15 мкг/мл, 30 и 150 мкг/мл соответственно. Также подтверждали зависящую от концентрации пролиферацию клеток агонистического антитела к CD30.

#### Промышленная применимость

Т-клетки можно эффективно многократно культивировать с целью экспансии путем культивирования CD3-позитивных клеток в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта и агониста CD30. Когда культивируемые CD3-позитивные клетки представляют собой CD3-позитивные CD8-позитивные клетки или CD3-позитивные CD8-позитивные CD30-позитивные клетки, продуцируемые или культивируемые с целью экспансии клетки легко превращаются в эффекторные Т-клетки и проявляют цитотоксическую активность. Следовательно, их можно применять в Т-клеточной терапии.

Настоящее изобретение основан на патентных заявках Японии № 2018-151580 (дата подачи: 10 августа 2018 г.), № 2019-042666 (дата подачи: 8 марта 2019 г.) и № 2019-117878 (дата подачи: 25 июня 2019), содержание которых включено в настоящее описание во всей своей полноте.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ продуцирования CD3-позитивной клетки, включающий этап (I) культивирования CD3-позитивной клетки в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта, агониста CD30 и IL-21 и/или ингибитор апоптоза, где CD3-позитивная клетка представляет собой Т-клетку.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий этап (II) культивирования CD3-позитивных клеток, культивированных на этапе (I), в отсутствие агониста комплекса CD3/TCR и фибронектина или его варианта и в присутствии агониста CD30.

3. Способ по п.1 или 2, в котором CD3-позитивную клетку получают из плюрипотентной стволовой клетки.

4. Способ по п.3, в котором плюрипотентная стволовая клетка представляет собой индуцированную плюрипотентную стволовую клетку.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором CD3-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную клетку, экспрессирующую химерный антигенный рецептор.

6. Способ по любому из пп.1-5, в котором CD3-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную клетку.

7. Способ по п.6, в котором CD3-позитивная CD8-позитивная клетка представляет собой CD3-позитивную CD8-позитивную CD4-негативную клетку.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором CD3-позитивная клетка представляет собой  $\gamma$ TCR-позитивную и/или  $\delta$ TCR-позитивную клетку.

9. Способ по любому из пп.1-8, в котором агонист комплекса CD3/TCR представляет собой агонист CD3 и/или агонист TCR.

10. Способ по п.9, в котором агонист CD3 представляет собой агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент.

11. Способ по п.10, в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело UCНТ1 к человеческому CD3 $\epsilon$  или его связывающий фрагмент.

12. Способ по п.9, в котором агонист TCR представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из анти-TCR антитела или его связывающего фрагмента, комплекса HLA/пептид или его мультимера и комплекса HLA/суперантиген или его мультимера.

13. Способ по п.10 или 11, в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент иммобилизуют на культуральном контейнере.

14. Способ по п.13, в котором агонистическое антитело к CD3 или его связывающий фрагмент иммобилизуют путем контактирования 1-50000 нг/мл агонистического антитела к CD3 или его связывающего фрагмента с культуральным контейнером.

15. Способ по любому из пп.1-14, в котором фибронектин или его вариант представляет собой РетроНектин.

16. Способ по п.15, в котором РетроНектин иммобилизуют на культуральном контейнере.

17. Способ по п.16, в котором РетроНектин иммобилизуют путем приведения в контакт 1-150 мкг/мл РетроНектина с культуральным контейнером.

18. Способ по любому из пп.1-17, в котором агонист CD30 представляет собой по меньшей мере один, выбранный из группы, состоящей из агонистического антитела к CD30 или его связывающего фрагмента и лиганда CD30 или его связывающего фрагмента.

19. Способ по п.18, в котором агонистическое антитело к CD30 или его связывающий фрагмент содержится в среде.

20. Способ по п.19, в котором концентрация агонистического антитела к CD30 или его связываю-

шего фрагмента в среде составляет 1-1000 нг/мл.

21. Способ по любому из пп.1-20, в котором среда содержит по меньшей мере одно, выбранное из IL-7, IL-15 и IL-18.

22. Способ по п.21, в котором среда содержит IL-7, IL-15 и IL-18.

23. Способ по п.21 или 22, в котором среда дополнительно содержит TL1A и/или IL-12.

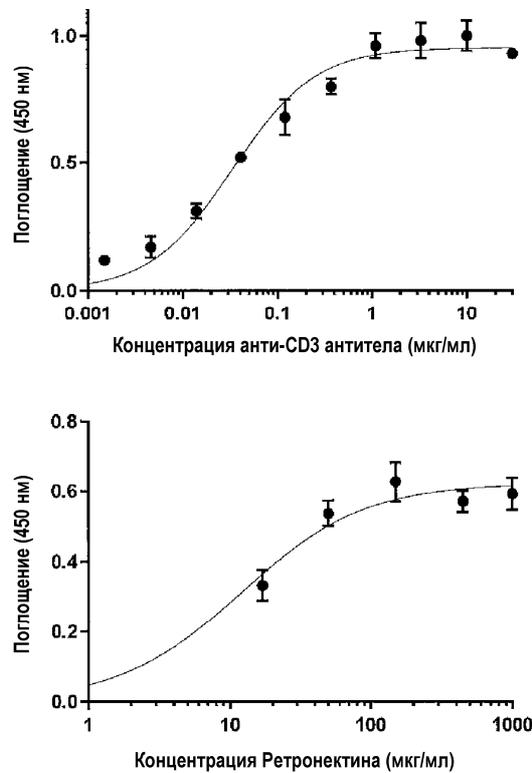
24. Способ по любому из пп.1-23, в котором продуцируемая CD3-позитивная клетка также является CD197-позитивной.

25. Способ экспансии в культуре CD3-позитивной клетки, включающий этап культивирования CD3-позитивной клетки в присутствии агониста комплекса CD3/TCR, фибронектина или его варианта, агониста CD30 и IL-21 и/или ингибитор апоптоза, где CD3-позитивная клетка представляет собой Т-клетку.

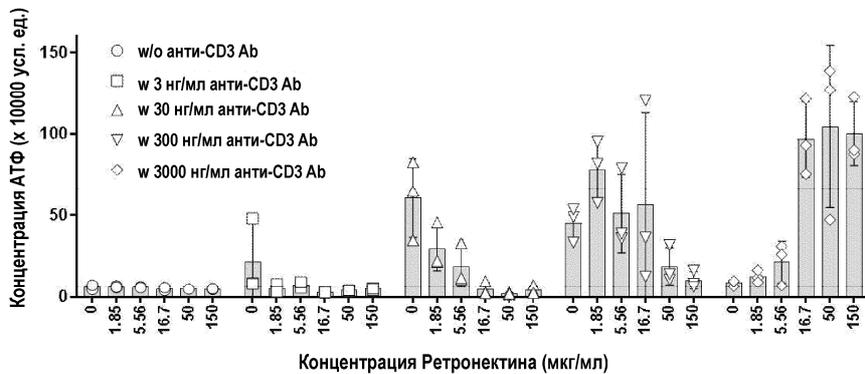
26. Набор для экспансии в культуре CD3-позитивных клеток, содержащий следующее:

(1) культуральный контейнер, на котором иммобилизованы агонист комплекса CD3/TCR и фибронектин или его вариант; и

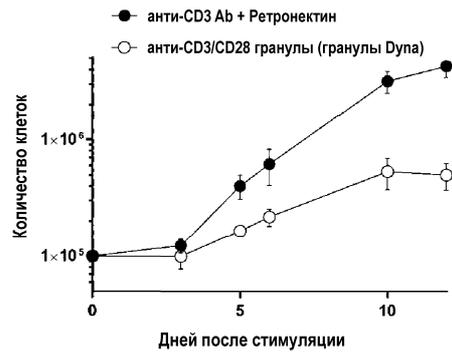
(2) среду, содержащую агонист CD30 и IL-21 и/или ингибитор апоптоза, где CD3-позитивная клетка представляет собой Т-клетку.



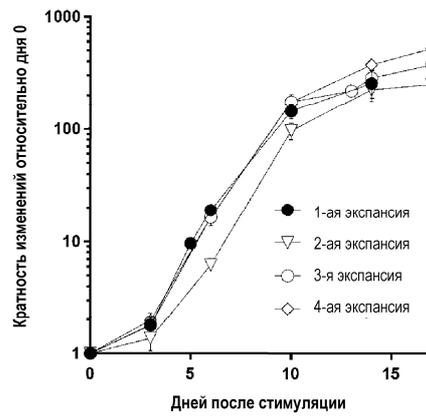
Фиг. 1



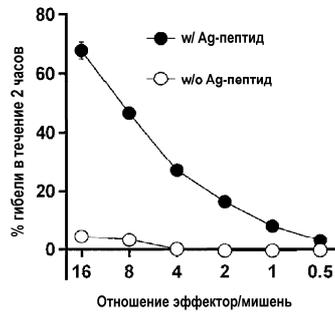
Фиг. 2



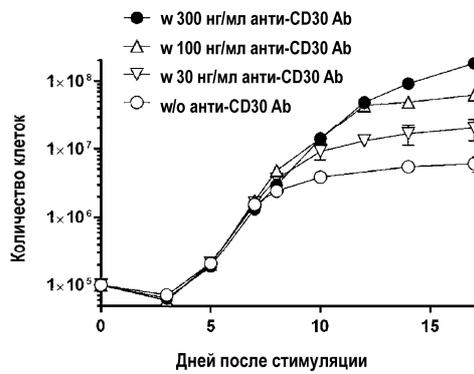
Фиг. 3



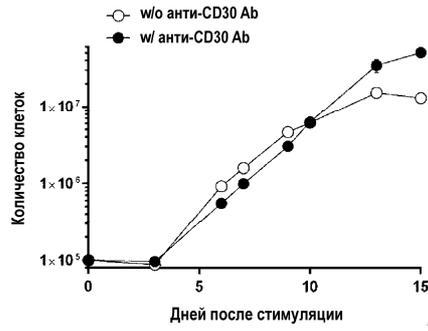
Фиг. 4



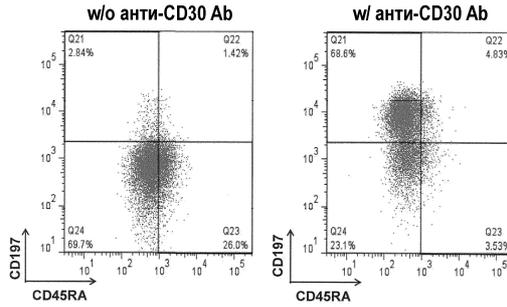
Фиг. 5



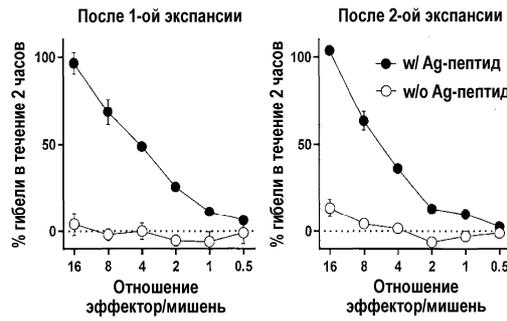
Фиг. 6



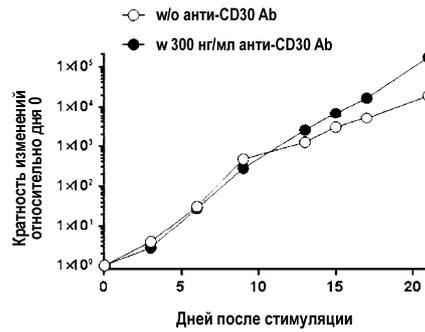
Фиг. 7



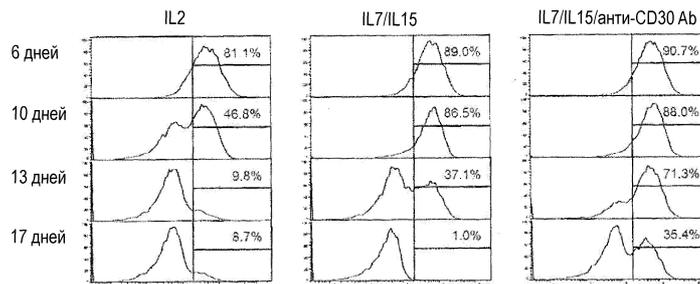
Фиг. 8



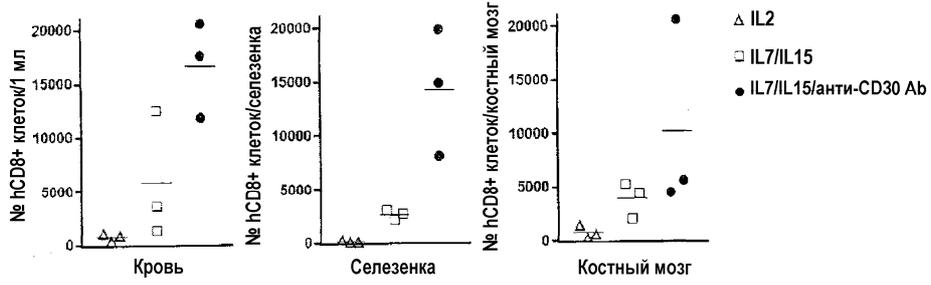
Фиг. 9



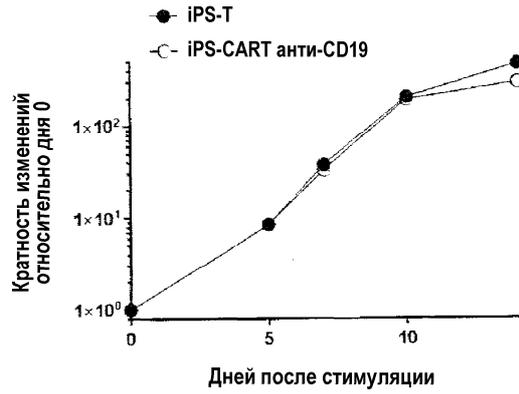
Фиг. 10



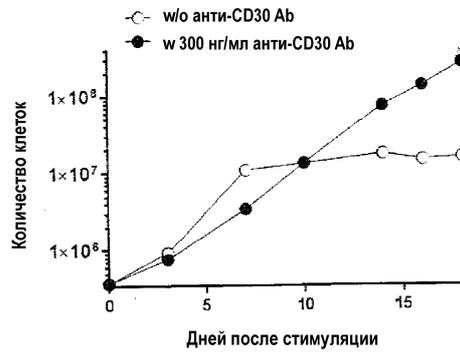
Фиг. 11



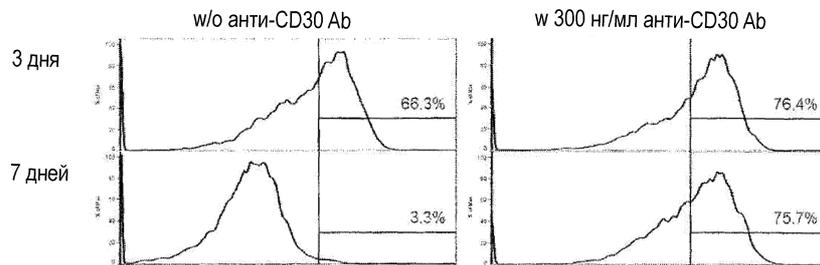
Фиг. 12



Фиг. 13

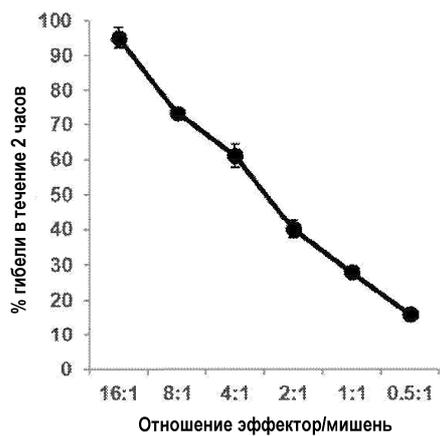


Фиг. 14

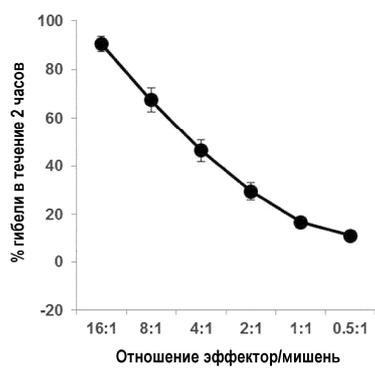


Фиг. 15

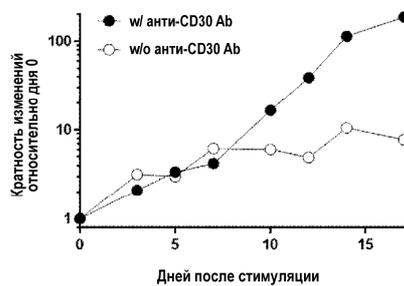
048217



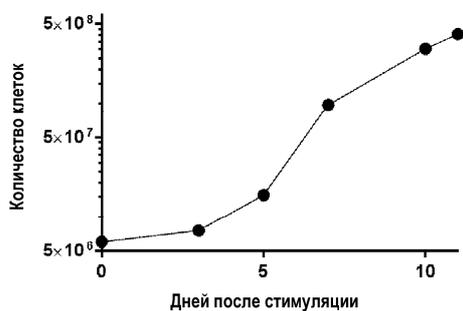
Фиг. 16



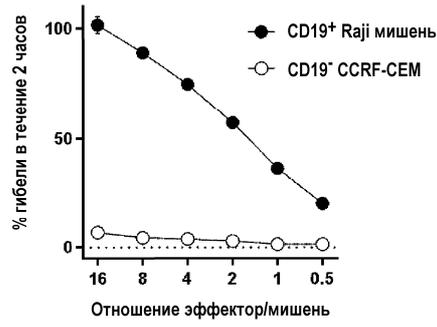
Фиг. 17



Фиг. 18



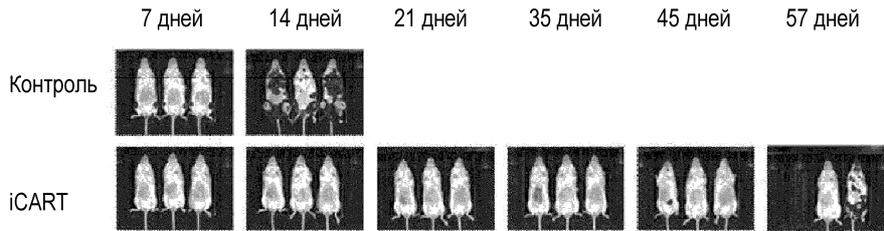
Фиг. 19



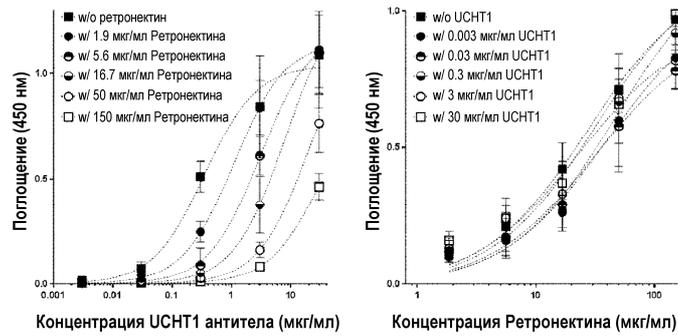
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

