

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490426** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.09.30

(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.07.12

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ $\gamma\delta$ T-КЛЕТОК**

(31) **2018-133727; 2019-117891**

(32) **2018.07.13; 2019.06.25**

(33) **JP**

(62) **202190265; 2019.07.12**

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

(72) Изобретатель:

**Канеко Син, Иригути Соити, Уеда
Тацуки, Кассаи Йосиаки, Хаяси
Акира, Накаяма Кадзухиде (JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения $\gamma\delta$ T-клетки из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, при этом индуцированная плюрипотентная стволовая клетка получена из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки.

202490426

A2

A2

202490426

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ $\gamma\delta$ T-КЛЕТОК

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001]

Настоящее изобретение относится к способу получения $\gamma\delta$ T-клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, $\gamma\delta$ T-клеткам, дифференцированным из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, клеточной популяции, содержащей такие клетки, и тому подобному.

[0002]

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В последние годы терапия иммунными клетками привлекает внимание в качестве способа лечения рака. Терапия иммунными клетками представляет собой терапевтический метод, включающий размножение и активацию иммунных клеток вне тела пациента и введение иммунных клеток пациенту, чтобы иммунные клетки могли атаковать раковые клетки. Терапия иммунными клетками обладает тем преимуществом, что она почти не вызывает побочные эффекты в сравнении с общепринятыми основными тремя видами лечения, включающими хирургическое вмешательство, лучевую терапию и химиотерапию. Существуют различные виды лечения в терапии иммунными клетками. Среди них особое внимание привлекает лечение с использованием $\gamma\delta$ T-клеток, которые отвечают за естественный иммунитет и обладают цитотоксической активностью в отношении раковых клеток.

[0003]

Для терапии $\gamma\delta$ T-клетками необходима разработка способа получения для эффективного производства и стабильной поставки клеток для клеточной терапии. Хотя способ отбора лишь $\gamma\delta$ T-клеток в крови пациента (способ культивирования клеток крови в среде, содержащей зольдроновую кислоту и IL-2 (патентный документ 1)) известен, способ получения $\gamma\delta$ T-клеток из стволовых клеток не был описан ранее, насколько известно авторам изобретения.

СПИСОК ДОКУМЕНТОВ

Патентный документ

[0004]

Патентный документ 1 WO 2006/006720

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая проблема

[0005]

Задачей настоящего изобретения является предложение способа получения $\gamma\delta$ T-клеток из стволовых клеток. Задачей настоящего изобретения также является предложение $\gamma\delta$ T-клеток, дифференцированных из стволовых клеток, и клеточной популяции, содержащей такие клетки.

Решение проблемы

[0006]

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования в попытке решить вышеуказанные задачи и установили, что $\gamma\delta$ T-клетки могут быть эффективно получены путем индукции плюрипотентных стволовых клеток из клеток, отличных от $\alpha\beta$ T-клеток, и дальнейшей индукции этих клеток в T-клетки. Кроме того, были получены $\gamma\delta$ T-клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), путем введения гена CAR в полученные таким способом $\gamma\delta$ T-клетки. Было обнаружено, что эти $\gamma\delta$ T-клетки проявляют высокую цитотоксичность даже в отношении раковых клеток, которые $\gamma\delta$ T-клетки до введения с трудом узнают и повреждают. Исходя из полученных результатов, авторы настоящего изобретения провели дополнительные исследования и осуществили настоящее изобретение.

[0007]

Таким образом, по настоящему изобретению предложено следующее.

[1] Способ получения $\gamma\delta$ T-клетки из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, при этом индуцированная плюрипотентная стволовая клетка получена из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки.

[2] Способ по п. [1], включающий следующие этапы:

(1) этап получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки, и

(2) этап дифференциации индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной на этапе (1), в T-клетку.

[3] Способ по п. [1] или [2], при этом клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой мононуклеарную клетку, отличную от $\alpha\beta$ T-клетки.

[4] Способ по любому из пунктов [1] - [3], при этом клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой моноцит.

[5] Способ по любому из пунктов [2] - [4], включающий этап введения

(i) нуклеиновой кислоты, кодирующей α TCR, и нуклеиновой кислоты, кодирующей β TCR,

(ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей γ TCR, и нуклеиновой кислоты, кодирующей δ TCR, и/или

(iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR,

каждый из которых узнает и связывает опухоль-специфический антиген или опухоль-ассоциированный антиген, в клетку, полученную на любом из этапов (1) и (2).

[6] Способ по п. [5], при этом γ TCR представляет собой $V\gamma 9$ TCR, и δ TCR представляет собой $V\delta 2$ TCR.

[7] Способ по любому из пунктов [1] - [6], включающий этап введения нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α , в клетку, полученную на любом из этапов (1) и (2).

[8] $\gamma\delta$ T-клетка, полученная из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, при этом индуцированная плюрипотентная стволовая клетка получена из клетки, отличной

от $\alpha\beta$ T-клетки.

[9] $\gamma\delta$ T-клетка, полученная способом по любому из пунктов [1] - [7].

[10] Клетка по п. [8] или [9], при этом клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой мононуклеарную клетку, отличную от $\alpha\beta$ T-клетки.

[11] Клетка по любому из пунктов [8] - [10], при этом клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой моноцит.

[12] Клетка по любому из пунктов [8] - [11], при этом $\gamma\delta$ T-клетка экспрессирует V γ 9TCR и V δ 2TCR.

[13] Клетка по любому из пунктов [8] - [12], при этом $\gamma\delta$ T-клетка экспрессирует CAR.

[14] Клетка по любому из пунктов [8] - [13], при этом $\gamma\delta$ T-клетка экспрессирует слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α .

[15] Клеточная популяция, в которой не менее 90% всех клеток представляют собой $\gamma\delta$ T-клетки, при этом $\gamma\delta$ T-клетка представляет собой клетку, дифференцированную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки.

[16] Лекарственное средство, содержащее клетку по любому из пунктов [8] - [14] или клеточную популяцию по п. [15].

[17] Лекарственное средство по п. [16] для применения в предотвращении или лечении опухоли.

[18] Средство уничтожения для клетки, представляющее собой клетку по любому из пунктов [8] - [14] или клеточную популяцию по п. [15].

[19] Клетка по любому из пунктов [8] - [14] или клеточная популяция по п. [15] для применения в предотвращении или лечении опухоли.

[20] Применение клетки по любому из пунктов [8] - [14] или клеточной популяции по п. [15] в производстве превентивного средства или терапевтического средства для опухоли.

[21] Способ предотвращения или лечения опухоли, включающий введение клетки по любому из пунктов [8] - [14] или клеточной популяции по п. [15].

ПОЛЕЗНЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008]

По настоящему изобретению могут быть предложены: способ получения $\gamma\delta$ T-клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, $\gamma\delta$ T-клетки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, клеточная популяция, содержащая такие клетки, и тому подобное. Кроме того, среди $\gamma\delta$ T-клеток, полученных вышеуказанным способом, клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), могут проявлять *in vitro* и *in vivo* высокую цитотоксическую активность, специфическую в отношении антигена, узнаваемого CAR.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0009]

На Фиг. 1 представлены результаты, полученные путем окрашивания полученных клеток с использованием набора антител ($V\delta 1$ Myltenyi FITC, $V\delta 2$ Myltenyi APC, $\gamma\delta$ TCR BD BV510, CD3 BioLegend APC/Cy7 и $\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC). Заштрихованные пики показывают результаты группы без окрашивания, и незаштрихованные пики показывают результаты окрашивания с использованием каждого антиген-специфического антитела.

На Фиг. 2 представлены результаты проточной цитометрии, полученные путем окрашивания полученных клеток с использованием набора антител ($V\delta 1$ Myltenyi FITC, $V\delta 2$ Myltenyi APC, $\gamma\delta$ TCR BD BV510, CD3 BioLegend APC/Cy7 и $\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC).

На Фиг. 3 представлены результаты измерения цитотоксической активности полученных $\gamma\delta$ Т-клеток. По вертикальной оси показана цитотоксическая активность (%), и по горизонтальной оси показано соотношение числа смешанных $\gamma\delta$ Т-клеток и числа клеток-мишеней.

На Фиг. 4 представлены результаты измерения клеточной пролиферации полученных из иПС клеток $\gamma\delta$ Т-клеток ($i\gamma\delta$ Т-клеток). По вертикальной оси показана скорость клеточной пролиферации, и по горизонтальной оси показано число дней, прошедших со дня, когда была начата стимуляция анти-CD3 антителом (UCHT1) и анти-CD30 антителом.

На Фиг. 5 показана экспрессия молекул CD3 и $\gamma\delta$ TCR на поверхности клеточной мембраны $\gamma\delta$ Т-клеток ($i\gamma 9\delta 2$ Т-клеток), дифференцированных путем введения гена $V\gamma 9V\delta 2$ TCR в иПС клетки.

На Фиг. 6 показана экспрессия молекул CD3 и $\gamma\delta$ TCR на поверхности клеточной мембраны $\gamma\delta$ Т-клеток ($iH\gamma 9\delta 2$ Т-клеток), дифференцированных путем введения гена $V\gamma 9V\delta 2$ TCR в гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП).

На Фиг. 7 представлены результаты измерения клеточной пролиферации $i\gamma\delta$ Т-клеток ($iCD19CAR/IL-15\gamma\delta$ Т-клеток), экспрессирующих ген анти-CD19-CAR. По вертикальной оси показано число клеток, и по горизонтальной оси показано число дней, прошедших со дня, когда была начата стимуляция анти-CD3 антителом (UCHT1) и анти-CD30 антителом.

На Фиг. 8 представлены результаты измерения клеточной пролиферации $iH\gamma 9\delta 2$ Т-клеток ($iHCD19CAR/IL-15\gamma 9\delta 2$ Т), экспрессирующих ген анти-CD19-CAR. По вертикальной оси показано число клеток, и по горизонтальной оси показано число дней, прошедших со дня, когда была начата стимуляция анти-CD3 антителом (UCHT1).

На Фиг. 9 представлены результаты измерения цитотоксической активности $i\gamma\delta$ Т-клеток ($iCD19CAR/IL-15\gamma\delta$ Т-клеток), экспрессирующих ген анти-CD19-CAR. По вертикальной оси показана степень повреждения клеток-мишеней (%), и по горизонтальной оси показано соотношение числа смешанных $iCD19CAR/IL-15\gamma\delta$ Т-клеток и числа клеток-мишеней.

На Фиг. 10 представлены результаты измерения цитотоксической активности $iH\gamma 9\delta 2$ Т-клеток ($iHCD19CAR/IL-15\gamma 9\delta 2$ Т-клеток), экспрессирующих ген анти-CD19-CAR. По вертикальной оси показана степень повреждения клеток-мишеней (%), и по

горизонтальной оси показано соотношение числа смешанных iHCD19CAR/IL-15 γ 9 δ 2T-клеток и числа клеток-мишеней.

На Фиг. 11 показан эффект *in vivo* введения i γ δ T-клеток (iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток), экспрессирующих ген анти-CD19-CAR, на число дней выживания мышей, несущих опухоль, положительную по CD19 человека. По вертикальной оси показана выживаемость мышей, и по горизонтальной оси показано число дней, прошедших со дня, когда были трансплантированы раковые клетки.

На Фиг. 12 показан противоопухолевый эффект *in vivo* введения iH γ 9 δ 2T-клеток, экспрессирующих ген анти-CD19-CAR (iHCD19CAR/IL-15 γ 9 δ 2T), мышам с трансплантированной экспрессирующей люциферазу человеческой опухолью.

[0010]

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящей спецификации термин «экспрессия гена» охватывает как синтез мРНК с конкретной нуклеотидной последовательности гена (также называемый транскрипцией или экспрессией мРНК), так и синтез белка на основании информации мРНК (также называемый трансляцией или экспрессией белка). Если не указано иначе, термин «экспрессия гена», или просто «экспрессия», означает экспрессию белка.

[0011]

В настоящей спецификации термин «положительные» означает, что белок или мРНК экспрессируется в количестве, поддающемся обнаружению методом, известным в данной области. Белок может быть обнаружен в иммунологическом анализе с использованием антитела, таком как ELISA, иммуноокрашивание и проточная цитометрия. В случае белка, который экспрессируется внутри клетки и не появляется на клеточной поверхности (например, фактор транскрипции или его субъединица, и тому подобное), белок-репортер экспрессируется совместно с таким белком, и белок-мишень может быть обнаружен путем обнаружения белка-репортера. мРНК может быть обнаружена, например, методом амплификации нуклеиновой кислоты и/или методом обнаружения нуклеиновой кислоты, таким как ОТ-ПЦР, микрочипы, биочипы, РНКсек и тому подобное.

[0012]

В настоящей спецификации термин «отрицательные» означает, что уровень экспрессии белка или мРНК меньше нижнего предела обнаружения при использовании всех, или любого из, вышеупомянутых известных методов. Нижний предел обнаружения экспрессии белка или мРНК может варьироваться в зависимости от каждого метода.

[0013]

В настоящей спецификации «положительные» также означает «экспрессирующие белок или мРНК», и «отрицательные» также означает «не экспрессирующие белок или мРНК». Таким образом, уточнение «наличие или отсутствие экспрессии» означает нахождение клеток в состоянии, когда уровень экспрессии искомого белка, или мРНК-мишени, не ниже, чем нижний предел обнаружения (положительные), или ниже, чем нижний предел обнаружения (отрицательные).

[0014]

В настоящей спецификации термин «культура» означает поддерживаемые, пролиферирующие (растущие) и/или дифференцирующиеся клетки в *in vitro* среде. «Культура» означает поддерживаемые, пролиферирующие (растущие) и/или дифференцирующиеся клетки вне ткани, или *ex vivo*, например, в планшете, чашке или флаконе для культивирования клеток.

[0015]

В настоящей спецификации «концентрирование» означает увеличение относительной доли конкретного составляющего компонента в композиции, такой как клеточная композиция и тому подобное, и «концентрированная» при использовании для описания клеточной композиции, например, клеточной популяции, означает, что количество конкретного составляющего компонента в клеточной популяции увеличилось в сравнении с количеством компонента в клеточной популяции до концентрирования. Например, композиция, такая как клеточная популяция и тому подобное, может быть сконцентрирована для целевого типа клеток. Таким образом, относительная доля целевого типа клеток увеличивается по сравнению с относительной долей целевых клеток, присутствующих в клеточной популяции до концентрирования. Клеточная популяция также может быть сконцентрирована для целевого типа клеток методом селекции или методом сортировки клеток, известным в данной области. Клеточная популяция также может быть сконцентрирована за счет конкретного метода культивирования, сортировки или селекции, описанного в настоящей спецификации. В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения клеточная популяция сконцентрирована до содержания по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% целевой клеточной популяции методом концентрирования целевой клеточной популяции.

[0016]

В настоящей спецификации «размножение культуры» означает культивирование с целью размножения нужной клеточной популяции и увеличения числа клеток. Увеличение числа клеток может быть достигнуто за счет увеличения числа клеток вследствие пролиферации, превышающего уменьшение числа клеток вследствие гибели, и для этого не требуется пролиферация всех клеток в клеточной популяции. Число клеток может увеличиваться в 1,1 раза, 1,2 раза, 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 9 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 100 раз, 300 раз, 500 раз, 1000 раз, 3000 раз, 5000 раз, 10000 раз, 100000 раз, или не менее чем 1000000 раз, в сравнении с числом до начала размножения.

[0017]

В настоящей спецификации «стимуляция» означает, что конкретное вещество связывается с различными рецепторами и тому подобным, активируя действующий далее сигнальный путь.

[0018]

В настоящей спецификации «клеточная популяция» означает две или более клеток одного и того же типа или разных типов. «Клеточная популяция» также означает массу клеток одного и того же типа или разных типов.

[0019]

1. Способ получения $\gamma\delta$ Т-клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Настоящее изобретение относится к способу получения $\gamma\delta$ Т-клеток из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ Т-клетки (далее в настоящем документе иногда сокращенно называемому «способ получения по настоящему изобретению»). Способ получения по настоящему изобретению включает этап дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в Т-клетки. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, используемые для способа получения по настоящему изобретению, могут представлять собой клетки, уже полученные и имеющиеся в запасе, и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть получены из клетки, отличной от $\alpha\beta$ Т-клетки. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения способ получения по настоящему изобретению включает (1) этап получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки из клетки, отличной от $\alpha\beta$ Т-клетки, и (2) этап дифференциации индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной на этапе (1), в Т-клетку.

[0020]

В настоящем изобретении «Т-клеточный рецептор (TCR)» состоит из димера цепей TCR (α -цепи, β -цепи, γ -цепи, δ -цепи). Термин « $\gamma\delta$ Т-клетка» означает клетку, которая экспрессирует CD3 и экспрессирует TCR, состоящий из γ -цепи TCR (γ TCR) и δ -цепи TCR (δ TCR) (далее в настоящем документе иногда называемый « $\gamma\delta$ TCR»). Термин « $\alpha\beta$ Т-клетка» означает клетку, которая экспрессирует CD3 и экспрессирует TCR, состоящий из α -цепи TCR (α TCR) и β -цепи TCR (β TCR) (далее в настоящем документе иногда называемый « $\alpha\beta$ TCR»). Почти все $\alpha\beta$ Т-клетки узнают комплекс антигенный пептид-МНС (главный комплекс гистосовместимости, в случае человека, HLA: человеческий лейкоцитарный антиген) за счет $\alpha\beta$ TCR (это называют ограничением по МНС). Напротив, $\gamma\delta$ Т-клетка узнает различные молекулы, экспрессируемые клетками, за счет $\gamma\delta$ TCR независимо от молекулы МНС. Каждая цепь TCR состоит из переменной области и константной области, и переменная область содержит три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2, CDR3). Ген TCR состоит из множества V (переменных), D (разнообразных), J (соединительных) и C (константных) генных сегментов в геноме. Восстановление генов осуществляется в процессе дифференциации и созревания Т-клеток, по одному из D и J случайно отбираются и связываются в ген β -цепи, затем восстановление гена происходит между V-DJ. Во время этого процесса вставка и делеция основания случайным образом происходит между V-D и D-J, и разнообразие генов увеличивается. В мРНК-предшественнике TCR происходит сплайсинг РНК в области VDJ и области C (общей области), и ген экспрессируется в виде функционального гена TCR.

[0021]

Примеры γ TCR включают $V\gamma 1$ TCR, $V\gamma 2$ TCR, $V\gamma 3$ TCR, $V\gamma 4$ TCR, $V\gamma 5$ TCR, $V\gamma 6$ TCR, $V\gamma 7$ TCR, $V\gamma 8$ TCR и $V\gamma 9$ TCR, и примеры δ TCR включают $V\delta 1$ TCR, $V\delta 2$ TCR, $V\delta 3$ TCR, $V\delta 4$ TCR, $V\delta 5$ TCR, $V\delta 6$ TCR, $V\delta 7$ TCR, $V\delta 8$ TCR и $V\delta 9$ TCR. Хотя сочетание конкретных γ TCR и δ TCR не имеет ограничений, можно упомянуть, например, $V\gamma 3V\delta 1$ TCR, $V\gamma 4V\delta 1$ TCR, $V\gamma 9V\delta 1$ TCR и $V\gamma 9V\delta 2$ TCR.

[0022]

(1) Этап получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки

В настоящем изобретении термин «индуцированная плюрипотентная стволовая клетка» (далее в настоящем документе иногда называемая «иПС клетка») означает стволовую клетку, которая получена путем введения фактора перепрограммирования в соматическую клетку, обладает плюрипотентностью, допускающей дифференциацию во многие клетки, имеющиеся в живых организмах, и также обладает способностью к пролиферации. Термин охватывает любую клетку, индуцированную в гемопоэтическую клетку-предшественник, используемую по настоящему изобретению. Индуцированная плюрипотентная стволовая клетка предпочтительно получена от млекопитающего (например, мыши, крысы, хомяка, морской свинки, собаки, обезьяны, орангутанга, шимпанзе, человека), более предпочтительно, человека.

[0023]

Способ получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки известен в соответствующей области, и клетка может быть получена путем введения фактора перепрограммирования в любую соматическую клетку. При использовании в настоящем документе фактор перепрограммирования включает, например, гены и продукты генов, такие как Oct3/4, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Klf4, Klf2, c-Myc, N-Myc, L-Myc, Nanog, Lin28, Fbx15, ERas, ECAT15-2, Tcl1, бета-катенин, Lin28b, Sall1, Sall4, Esrrb, Nr5a2, Tbx3, Glis1 и тому подобное. Эти факторы перепрограммирования могут быть использованы отдельно или в сочетании. Примерами сочетания факторов перепрограммирования являются сочетания, описанные в WO 2007/069666, WO 2008/118820, WO 2009/007852, WO 2009/032194, WO 2009/058413, WO 2009/057831, WO 2009/075119, WO 2009/079007, WO 2009/091659, WO 2009/101084, WO 2009/101407, WO 2009/102983, WO 2009/114949, WO 2009/117439, WO 2009/126250, WO 2009/126251, WO 2009/126655, WO 2009/157593, WO 2010/009015, WO 2010/033906, WO 2010/033920, WO 2010/042800, WO 2010/050626, WO 2010/056831, WO 2010/068955, WO 2010/098419, WO 2010/102267, WO 2010/111409, WO 2010/111422, WO 2010/115050, WO 2010/124290, WO 2010/147395, WO 2010/147612, Huangfu D, *et al.* (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797, Shi Y, *et al.* (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528, Eminli S, *et al.* (2008), Stem Cells. 26:2467-2474, Huangfu D, *et al.* (2008), Nat. Biotechnol. 26:1269-1275, Shi Y, *et al.* (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574, Zhao Y, *et al.* (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479, Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135, Feng B, *et al.* (2009), Nat. Cell Biol. 11:197-203, R.L. Judson *et al.*, (2009), Nat. Biotechnol., 27:459-461, Lyssiotis CA, *et al.* (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917, Kim JB, *et al.* (2009), Nature. 461:649-

643, Ichida JK, *et al.* (2009), *Cell Stem Cell*. 5:491-503, Heng JC, *et al.* (2010), *Cell Stem Cell*. 6:167-74, Han J, *et al.* (2010), *Nature*. 463:1096-100, Mali P, *et al.* (2010), *Stem Cells*. 28:713-720 и Maekawa M, *et al.* (2011), *Nature*. 474:225-9.

[0024]

Примеры соматических клеток включают, но без ограничения, любые из эмбриональных соматических клеток, неонатальных соматических клеток и зрелых соматических клеток, а также любые из первичных культивируемых клеток, субкультивированных клеток, и сформированных линий клеток. Кроме того, клетки, описанные выше, могут быть здоровыми клетками или больными клетками. Конкретные примеры соматических клеток включают (1) тканевые стволовые клетки (соматические стволовые клетки), такие как нервные стволовые клетки, гемопоэтические клетки-предшественники, мезенхимальные стволовые клетки и стволовые клетки зубной пульпы; (2) тканевые клетки-предшественники и (3) дифференцированные клетки, такие как клетки крови (например, клетки периферической крови, клетки пуповинной крови и тому подобное), мононуклеарные клетки (например, лимфоциты (NK-клетки, В-клетки, Т-клетки, отличные от $\alpha\beta$ T-клеток (например, $\gamma\delta$ T-клетки и тому подобное), моноциты, дендритные клетки и тому подобное)), гранулоциты (например, эозинофилы, нейтрофилы, базофилы), мегакариоциты), эпителиальные клетки, эндотелиальные клетки, мышечные клетки, фибробласты (например, клетки кожи и тому подобное), клетки волос, клетки печени, клетки слизистой оболочки желудка, энтероциты, клетки селезенки, клетки поджелудочной железы (например, экзокринные клетки поджелудочной железы и тому подобное), клетки мозга, клетки легкого, клетки почки и адипоциты. Среди них, мононуклеарные клетки, отличные от $\alpha\beta$ T-клеток, являются предпочтительными, более конкретно, моноциты или $\gamma\delta$ T-клетки являются предпочтительными.

[0025]

В качестве метода введения фактора перепрограммирования в соматическую клетку, когда фактор перепрограммирования имеет форму ДНК, может быть использован, например, метод совместного осаждения фосфатом кальция, метод с использованием ПЭГ, метод электропорации, метод микроинъекции, метод липофекции и тому подобное. Например, можно использовать методы, описанные в *Cell Engineering*, дополнительный том 8, *New Cell Engineering experiment protocol*, 263-267 (1995) (издательство Shujunsha), *Virology*, vol. 52, 456 (1973), *Folia Pharmacol. Jpn.*, vol. 119 (No. 6), 345-351 (2002), и тому подобное. При использовании вирусного вектора нуклеиновую кислоту вводят в соответствующую клетку-упаковщик (например, клетку Plat-E) и используют комплементационную линию клеток (например, клетки 293), вирусный вектор, продуцируемый в культуральный супернатант, извлекают, и клетки инфицируют вектором, используя метод, подходящий для каждого вирусного вектора, посредством чего вектор вводят в клетки. Например, в случае использования ретровирусного вектора в качестве вектора конкретный метод описан в WO 2007/69666, *Cell*, 126, 663-676 (2006) и *Cell*, 131, 861-872 (2007), и тому подобном. В частности, при использовании ретровирусного вектора

высокоэффективную трансфекцию в различные клетки можно осуществлять за счет применения рекомбинантного фрагмента СН-296 фибронектина (производства компании Takara Bio Inc.).

[0026]

Фактор перепрограммирования в форме РНК может быть непосредственно введен в клетки и экспрессирован в клетках. В качестве метода введения РНК можно использовать известный метод и, например, предпочтительно можно использовать метод липофекции, метод электропорации или тому подобное. Когда фактор перепрограммирования имеет форму белка, его можно вводить в клетку таким методом, как липофекция, слияние с проникающим через клеточную мембрану пептидом (например, полученным из ВИЧ пептидом ТАТ и полиаргинином), микроинъекция и тому подобное, и тому подобное.

[0027]

Примеры минимальной среды включают, но без ограничения, среду Дульбекко (например, IMDM), среду Игла (например, DMEM, EMEM, BME, MEM, α 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 ЭС клеток приматов (культуральную среду для ЭС/иПС клеток приматов, Reprocell), среду для ЭС клеток мышей (культуральную среду TX-WES, Thromb-X), бессывороточную среду (mTeSR, Stemcell Technologies), ReproFF, StemSpan (зарегистрированная торговая марка) SFEM, StemSpan (зарегистрированная торговая марка) H3000, StemlineII, среду ESF-B, среду ESF-C, среду CSTI-7, нейробазальную среду (Life Technologies), среду StemPro-34, StemFit (зарегистрированная торговая марка) (например, StemFit AK03N, StemFit AK02N) и тому подобное. Кроме того, эти среды можно смешивать, при необходимости, и использовать, например, можно упомянуть среду DMEM/F12 и тому подобное.

[0028]

Минимальная среда может быть соответствующим образом дополнена 10% - 20% сывороткой (эмбриональной бычьей сывороткой (ЭБС), человеческой сывороткой, лошадиной сывороткой) или заменителем сыворотки (KSR и тому подобным), инсулином, различными витаминами, L-глутамином, различными аминокислотами, такими как несущественные аминокислоты и тому подобное, 2-меркаптоэтанолом, различными цитокинами (интерлейкинами (IL-2, IL-7, IL-15 и так далее), SCF (фактором стволовых клеток), активином и тому подобным), различными гормонами, различными факторами роста (лейкоз-ингибирующим фактором (LIF), основным фактором роста фибробластов (bFGF), TGF- β и так далее), различными внеклеточными матриксами, различными молекулами клеточной адгезии, антибиотиками, такими как пенициллин/стрептомицин, пурамицин и тому подобное, индикатором pH, таким как феноловый красный и тому подобное, и тому подобным.

[0029]

Культивирование предпочтительно проводят, например, в атмосфере с содержанием

1% - 10%, предпочтительно 2% - 5%, CO₂ при температуре, например, примерно 37°C - 42°C, предпочтительно примерно 37°C - 39°C, в течение примерно 25-50 дней.

[0030]

В настоящем изобретении млекопитающее, от которого получают соматическую клетку, не имеет конкретных ограничений и предпочтительно является человеком. Аутологичные клетки, аллогенные клетки, имеющие один и тот же, или практически один и тот же, тип HLA, аллогенные клетки, в которых скорректировано наличие или отсутствие экспрессии и/или уровня экспрессии HLA, и тому подобное, являются предпочтительными вследствие отсутствия отторжения. Что касается HLA, предпочтительно скорректировано наличие или отсутствие экспрессии и/или уровня экспрессии по меньшей мере части субъединиц, содержащихся в молекуле класса I и/или класса II.

[0031]

(2) Этап дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в Т-клетки

Способ дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в Т-клетки не имеет конкретных ограничений при условии, что индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в $\gamma\delta$ Т-клетки. В одном варианте осуществления настоящего изобретения этап дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в Т-клетки может включать (2-1) этап дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники и (2-2) этап дифференциации гемопоэтических клеток-предшественников в CD3-положительные Т-клетки.

[0032]

(2-1) Этап дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники

В настоящем изобретении «гемопоэтическая клетка-предшественник (ГКП)» означает CD34-положительную клетку, предпочтительно, CD34/CD43-дважды положительную (ДП) клетку. В настоящем изобретении гемопоэтическая клетка-предшественник и гемопоэтическая стволовая клетка не различаются и представляют собой одну и ту же клетку, если нет иных указаний.

[0033]

Способ дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в гемопоэтические клетки-предшественники не имеет конкретных ограничений при условии, что он способен приводить к дифференциации в гемопоэтические клетки-предшественники. Примеры включают способ, включающий культивирование плюрипотентных стволовых клеток в среде для индукции гемопоэтических клеток-предшественников, описанной, например, в WO 2013/075222, WO 2016/076415 и Liu S. *et al.*, *Cytotherapy*, 17 (2015); 344-358, и тому подобное.

[0034]

В настоящем изобретении среда, используемая для индукции в гемопоэтическую

клетку-предшественника, не имеет конкретных ограничений. Среду, используемую для культивирования животных клеток, можно готовить из минимальной среды. Минимальная среда может быть аналогичной средам, используемым на вышеописанном этапе (1). Среда может содержать сыворотку, или может не содержать сыворотку. 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, α -монотиоглицерин (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Glutamax (зарегистрированная торговая марка)), несущественные аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины и тому подобное.

[0035]

В настоящем изобретении «витамин С» означает L-аскорбиновую кислоту и ее производные, и «производное L-аскорбиновой кислоты» означает производные, которые становятся витамином С в результате ферментативной реакции в живом организме. Примеры производных L-аскорбиновой кислоты включают фосфат витамина С (например, 2-фосфат аскорбиновой кислоты), глюкозид аскорбиновой кислоты, этил-аскорбиновую кислоту, сложный эфир витамина С, аскорбил тетрагексилдеканоат, аскорбил стеарат и аскорбил 2-фосфат 6-пальмитат. Предпочтительным является фосфат витамина С (например, 2-фосфат аскорбиновой кислоты), и примеры фосфата витамина С включают фосфатные соли L-аскорбиновой кислоты, такие как L-аскорбил фосфат Na и L-аскорбил фосфат Mg.

[0036]

В случае использования витамина С витамин С предпочтительно добавляют (дополнительно вносят) каждые четыре дня, каждые три дня, каждые два дня или каждый день. Более предпочтительно, витамин С добавляют каждый день. В одном варианте осуществления витамин С добавляют в среду в количестве от 5 нг/мл до 500 нг/мл (например, в количестве, соответствующем 5 нг/мл, 10 нг/мл, 25 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл, 200 нг/мл, 300 нг/мл, 400 нг/мл или 500 нг/мл). В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5 мкг/мл - 500 мкг/мл (например, в количестве, соответствующем 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл).

[0037]

Среда, используемая на этапе (2-1), также может быть дополнена цитокином по меньшей мере одного вида, выбранным из группы, состоящей из BMP4 (костный морфогенетический белок 4), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), SCF (фактор стволовых клеток), TPO (тромбопоэтин), FLT-3L (лиганд Flt3) и bFGF (основной фактор роста фибробластов). Более предпочтительна среда для культивирования, дополненная BMP4, VEGF и bFGF, и еще более предпочтительна среда для культивирования,

дополненная BMP4, VEGF, SCF и bFGF.

[0038]

В случае использования цитокина его концентрация в среде может составлять, например, 5 нг/мл - 500 нг/мл для BMP4, 5 нг/мл - 500 нг/мл для VEGF, 5 нг/мл - 100 нг/мл для SCF, 1 нг/мл - 100 нг/мл для TPO, 1 нг/мл - 100 нг/мл для FLT-3L и 5 нг/мл - 500 нг/мл для bFGF.

[0039]

Вышеупомянутая среда может быть дополнена ингибитором TGF β . Ингибитор TGF β представляет собой низкомолекулярный ингибитор, который препятствует сигнальной трансдукции представителей семейства TGF β и включает, например, SB431542, SB202190 (оба описаны в R.K. Lindemann *et al.*, Mol. Cancer 2:20 (2003)), SB505124 (GlaxoSmithKline), NPC30345, SD093, SD908, SD208 (Scios), LY2109761, LY364947, LY580276 (Lilly Research Laboratories) и тому подобное. Например, если ингибитор TGF β представляет собой SB431542, его концентрация в среде предпочтительно составляет 0,5 мкМ - 100 мкМ.

[0040]

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки можно культивировать в виде адгезионной культуры или суспензионной культуры. В случае адгезионной культуры культивирование можно проводить в культуральном сосуде, покрытом компонентом внеклеточного матрикса, и культивирование можно проводить совместно с питающими клетками. Хотя питающие клетки не имеют конкретных ограничений, можно упомянуть, например, фибробласты (мышинные эмбриональные фибробласты (MEF), мышинные фибробласты (STO) и тому подобное). Питающие клетки предпочтительно инактивируют методом, известным как таковой, например, радиоактивным излучением (гамма-излучением и тому подобным), обработкой противораковым средством (митомицином C и тому подобным), и тому подобным. 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 тому подобное, глюкозаминогликан и протеогликан, такой как гиалуроновая кислота, хондроитин сульфат и тому подобное, белки клеточной адгезии, такие как фибронектин, витронектин, ламинин и тому подобное, и тому подобное.

[0041]

Суспензионное культивирование означает культивирование клеток без прикрепления к культуральному контейнеру, и не имеет конкретных ограничений. Для улучшения прикрепления клеток можно использовать культуральный контейнер без искусственной обработки (например, обработки с нанесением внеклеточного матрикса и тому подобного), или культуральный контейнер подвергают обработке с целью искусственного подавления прикрепления (например, обработке с нанесением полигидроксиэтилметакриловой кислоты (поли-HEMA) или неионного поверхностно-активного полиола (плюроники F-127 и так далее)). В суспензионной культуре предпочтительно формируют и культивируют эмбрионид (EB).

[0042]

В настоящем изобретении гемопоэтическую клетку-предшественник также можно получать из мешковидной структуры (также называемой ES-сумкой или иПС-сумкой), получаемой путем культивирования плюрипотентных стволовых клеток. Используемый в настоящем документе термин «мешковидная структура» означает происходящую из плюрипотентных стволовых клеток трехмерную мешковидную (с промежутками внутри) структуру, которая образована популяцией эндотелиальных клеток, и тому подобным, и содержит внутри гемопоэтические клетки-предшественники.

[0043]

Температурные условия не имеют конкретных ограничений. Температура составляет, например, от примерно 37°C до примерно 42°C, предпочтительно от примерно 37°C до примерно 39°C. Период культивирования могут соответствующим образом определять специалисты в данной области путем мониторинга количества гемопоэтических клеток-предшественников и/или тому подобного. Число дней культивирования не имеет ограничений при условии, что могут быть получены гемопоэтические клетки-предшественники. Примеры периода культивирования включают по меньшей мере 6 дней, не менее 7 дней, не менее 8 дней, не менее 9 дней, не менее 10 дней, не менее 11 дней, не менее 12 дней, не менее 13 дней и не менее 14 дней. Период культивирования предпочтительно составляет 14 дней. Хотя более длительный период культивирования, как правило, не создает проблем при получении гемопоэтических клеток-предшественников, он предпочтительно не превышает 35 дней, более предпочтительно не превышает 21 день. Культивирование можно проводить в условиях низкого содержания кислорода, и условие низкого содержания кислорода по настоящему изобретению означает, например, концентрацию кислорода 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5% или ниже.

[0044]

(2-2) Этап дифференциации гемопоэтических клеток-предшественников в CD3-положительные Т-клетки

Способ дифференциации гемопоэтических клеток-предшественников в CD3-положительные Т-клетки не имеет конкретных ограничений при условии, что он может приводить к дифференциации гемопоэтических клеток-предшественников в CD3-положительные Т-клетки. Примеры включают способ культивирования гемопоэтических клеток-предшественников в тех же условиях культивирования, что и условия в способе индукции Т-клеток из гемопоэтических клеток-предшественников, описанном в WO 2016/076415, WO 2017/221975, и тому подобное.

[0045]

В настоящем изобретении среда для индукции дифференциации в CD3-положительные Т-клетки не имеет конкретных ограничений, и среду, используемую для культивирования животных клеток, можно готовить на основе минимальной среды. Примеры минимальной среды включают среды, аналогичные минимальной среде, используемой на вышеописанном этапе (1). Среда может содержать сыворотку, или может

не содержать сыворотку. 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, α -монотиоглицерин (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Glutamaх (зарегистрированная торговая марка)), несущественные аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины и тому подобное.

[0046]

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

[0047]

На этапе (2-2) также предпочтительно присутствие ингибитора p38 и/или SDF-1 (фактора стромальных клеток 1). В настоящем изобретении «ингибитор p38» означает вещество, которое ингибирует функции белка p38 (MAP киназы p38). Примеры включают, но без ограничения, химический ингибитор p38, доминантно-негативный мутант p38 или кодирующую его нуклеиновую кислоту, и тому подобное.

[0048]

Примеры химического ингибитора p38 для применения по настоящему изобретению включают, но без ограничения, SB203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфонилфенил)-5-(4-пиридил)-1H-имидазол) и его производное, SB202190 (4-(4-фторфенил)-2-(4-гидроксифенил)-5-(4-пиридил)-1H-имидазол) и его производное, SB239063 (транс-4-[4-(4-фторфенил)-5-(2-метокси-4-пиримидинил)-1H-имидазол-1-ил]циклогексанол) и его производное, SB220025 и его производное, PD169316, RPR200765A, AMG-548, BIRB-796, SCIO-469, SCIO-323, VX-702 и FR167653. Эти соединения коммерчески доступны и, например, SB203580, SB202190, SC239063, SB220025 и PD169316 доступны от компании Calbiochem, а SCIO-469 и SCIO-323 доступны от компании Scios, и тому подобное. Химический ингибитор p38 предпочтительно представляет собой SB203580 (4-(4-фторфенил)-2-(4-метилсульфонилфенил)-5-(4-пиридил)-1H-имидазол) или его производное.

[0049]

Примеры доминантно-негативного мутанта p38 для применения по настоящему изобретению включают p38T180A, полученный путем внесения точечной мутации треонина в положении 180, находящегося в ДНК-связывающей области p38, на аланин,

p38Y182F, полученный путем внесения точечной мутации тирозина в положении 182 p38 у человека и мыши на фенилаланин и тому подобное. Ингибитор p38 содержится в среде в концентрации примерно 1 мкМ - примерно 50 мкМ. При использовании SB203580 в качестве ингибитора P38 он может содержаться в среде в концентрации 1 мкМ - 50 мкМ, 5 мкМ - 30 мкМ, 10 мкМ - 20 мкМ.

[0050]

SDF-1 для применения по настоящему изобретению может представлять собой не только SDF-1 α или его зрелую форму, но также такую изоформу, как SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ , SDF-1 ϕ и тому подобное, или ее зрелую форму, или их смесь в любом соотношении, или тому подобное. Предпочтительно, используют SDF-1 α . SDF-1 иногда называют CXCL-12 или PBSF.

[0051]

В настоящем изобретении одна или более аминокислот в аминокислотной последовательности SDF-1 могут быть заменены, делетированы, добавлены и/или вставлены при условии, что он обладает активностью хемокина (SDF-1 с такой заменой, делецией, добавлением и/или вставкой аминокислоты также будет назван «мутант SDF-1»). Аналогично, сахарная цепь может быть заменена, делетирована и/или добавлена в SDF-1 или мутанте SDF-1. Примеры мутанта вышеупомянутого SDF-1 включают мутанты, сохраняющие по меньшей мере 4 остатка цистеина (Cys30, Cys32, Cys55 и Cys71 в человеческой последовательности SDF-1 α) и имеющие не менее 90% идентичности с аминокислотной последовательностью природной молекулы, хотя аминокислотная мутация не ограничена перечисленными мутациями. SDF-1 можно получать от млекопитающего, например, человека или не являющегося человеком млекопитающего, такого как обезьяна, овца, бык, лошадь, свинья, собака, кошка, кролик, крыса, мышь и тому подобное. Например, белок, зарегистрированный в GenBank под регистрационным номером: NP_954637, может быть использован в качестве человеческого SDF-1 α , и белок, зарегистрированный в GenBank под регистрационным номером: NP_000600, может быть использован в качестве SDF-1 β .

[0052]

SDF-1 может быть приобретен коммерческим путем, очищен из природного источника, или получен путем пептидного синтеза или методами геной инженерии. SDF-1 содержится в среде в диапазоне концентраций, например, от примерно 10 нг/мл до примерно 100 нг/мл. Кроме того, альтернативную SDF-1 молекулу, имеющую SDF-1-подобную активность, также можно использовать вместо SDF-1. Примеры таких альтернативных SDF-1 молекул включают агонист CXCR4, и низкомолекулярное соединение, имеющее активность агониста CXCR4, и тому подобное, можно добавлять в среду вместо SDF-1.

[0053]

Среда для культивирования, используемая на этапе (2-2), также может быть дополнена цитокином по меньшей мере одного вида, предпочтительно всех видов,

выбранным из группы, состоящей из SCF, ТРО (тромбопоэтин), FLT-3L и IL-7. Его концентрация составляет, например, от 10 нг/мл до 100 нг/мл для SCF, от 10 нг/мл до 200 нг/мл для ТРО, от 1 нг/мл до 100 нг/мл для IL-7 и от 1 нг/мл до 100 нг/мл для FLT-3L.

[0054]

На этапе (2-2) гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать в виде адгезионной культуры или суспензионной культуры. В случае адгезионной культуры можно использовать культуральный сосуд с покрытием. Гемопоэтические клетки-предшественники можно культивировать совместно с питающими клетками и/или тому подобным. Примеры питающих клеток для совместного культивирования включают стромальную линию клеток из костного мозга, клетки OP9 (доступные от компании 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)). В настоящем изобретении в случае использования клеток OP9 в качестве питающих клеток, отдельно полученные DLL1 или DLL4, или слитый белок из DLL4 или DLL1 и Fc, или тому подобное, можно добавлять в среду для проведения совместного культивирования. В случае использования питающих клеток питающие клетки предпочтительно заменяют по мере необходимости в процессе культивирования. Замену питающих клеток можно проводить путем переноса конкретных культивируемых клеток на заранее высеянные питающие клетки. Замену можно проводить каждые пять дней, каждые четыре дня, каждые три дня или каждые два дня. Если гемопоэтические клетки-предшественники получают путем суспензионного культивирования эмбриоида, предпочтительно проводить адгезионное культивирование после диссоциации на отдельные клетки. Хотя клетки можно культивировать совместно с питающими клетками, культивирование предпочтительно проводят без использования питающих клеток.

В случае адгезионной культуры, и когда культуральный контейнер имеет покрытие, примеры покрывающего средства включают матригель (Niwa A, *et al.* PLoS One, 6(7):e22261, 2011)), коллаген, желатин, ламинин, гепаран-сульфат-протеогликан, RetroNectin (зарегистрированная торговая марка), слитый белок из DLL4 или DLL1, или DLL4 или DLL1 и Fc-области антитела (далее в настоящем документе иногда называемой Fc), и тому подобное (например, химеру DLL4/Fc), энтактин и/или их сочетание, и сочетание RetroNectin и слитого белка из DLL4 и Fc, и так далее, является предпочтительным.

[0055]

На этапе (2-2) температурные условия культивирования не имеют ограничений. Температура, например, составляет от примерно 37°C до примерно 42°C, предпочтительно от примерно 37°C до примерно 39°C. Период культивирования могут соответствующим образом определять специалисты в данной области путем мониторинга количества $\gamma\delta$ T-клеток и тому подобного. Число дней культивирования не имеет ограничений при условии, что могут быть получены $\gamma\delta$ T-клетки. Примеры периода культивирования включают, как

правило, по меньшей мере не менее 10 дней, не менее 12 дней, не менее 14 дней, не менее 16 дней, не менее 18 дней или не менее 20 дней. Период культивирования предпочтительно составляет 21 день. Кроме того, предпочтительно, если период культивирования не превышает 90 дней, и более предпочтительно, не превышает 42 дня.

[0056]

Популяция CD3-положительных Т-клеток, полученная на вышеописанном этапе, включает $\gamma\delta$ Т-клетки. Этап (2) может дополнительно включать следующий этап (2-3).

[0057]

(2-3) Этап концентрирования CD3-положительных Т-клеток

Способ концентрирования CD3-положительных Т-клеток не имеет конкретных ограничений при условии, что $\gamma\delta$ Т-клетки могут быть сконцентрированы. Например, можно упомянуть способ культивирования CD3-положительных Т-клеток в тех же условиях культивирования, что и условия на этапе индукции CD8-положительных Т-клеток из CD4/CD8-двойно положительных Т-клеток, описанные в WO 2016/076415, WO 2017/221975, и тому подобное.

[0058]

В настоящем изобретении среда, используемая для концентрирования CD3-положительных Т-клеток, не имеет конкретных ограничений, и среду, используемую для культивирования животных клеток, можно готовить на основе минимальной среды. Примеры минимальной среды включают среды, аналогичные минимальной среде, используемой на вышеописанном этапе (1). Среда может содержать сыворотку, или может не содержать сыворотку. 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, триглицерин (например, α -монотриглицерин (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, Glutamax (зарегистрированная торговая марка)), несущественные аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины, гормоны и тому подобное. В одном варианте осуществления настоящего изобретения могут присутствовать витамин С, такой как аскорбиновая кислота и тому подобное, инсулин, трансферрин, соединение селена (например, селенит натрия), цитокин, такой как IL-7, и тому подобное.

[0059]

В случае использования витамина С на этапе (2-3) витамин С может быть таким же, как описанный для этапа (2-1), и может быть добавлен аналогичным образом. В одном варианте осуществления концентрация витамина С в среде, или культуральной среде, предпочтительно составляет 5 мкг/мл - 200 мкг/мл. В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5 мкг/мл - 500 мкг/мл (например, количестве, соответствующем 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50

мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл).

[0060]

В случае использования гормона на этапе (2-3) примеры гормонов включают кортикальный гормон. Кортикальный гормон представляет собой глюкокортикоид или его производное, и в качестве примеров можно указать кортизона ацетат, гидрокортизон, кортизона флуроацетат, преднизолон, триамцинолон, метилпреднизолон, дексаметазон, бетаметазон и беклометазона дипропионат. Предпочтительным является дексаметазон. Если кортикальный гормон представляет собой дексаметазон, его концентрация в среде составляет 1 нМ - 100 нМ.

[0061]

На этапе (2-3) среда содержит агонист комплекса CD3/TCR. Агонист комплекса CD3/TCR не имеет конкретных ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную передавать сигнал от комплекса CD3/TCR к CD3-положительной клетке путем специфического связывания с комплексом CD3/TCR. Примеры агонистов комплекса CD3/TCR включают агонист CD3 и/или агонист TCR. В качестве агониста CD3 можно упомянуть анти-CD3 антитело-агонист (для упрощения называемое «анти-CD3 антитело») или его связывающий фрагмент, и в качестве агониста TCR можно упомянуть по меньшей мере одного представителя, выбранного из группы, состоящей из анти-TCR антитела-агониста (также для упрощения называемого «анти-TCR антитело») или его связывающего фрагмента, комплекса МНС/антигенный пептид или его мультимера, а также комплекса МНС/суперантиген или его мультимера. В случае использования анти-CD3 антитела анти-CD3 антитело 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 IgG. В качестве анти-CD3 антитела можно упомянуть антитело (ОКТ3), полученное из клона ОКТ3, антитело (UCHL1), полученное из клона UCHL1, и тому подобное, предпочтительно UCHL1. Концентрация анти-CD3 антитела в среде составляет, например, 10 нг/мл - 1000 нг/мл, предпочтительно 50 нг/мл - 800 нг/мл, более предпочтительно 250 нг/мл - 600 нг/мл. Вышеуказанный агонист комплекса CD3/TCR может быть приобретен коммерческим путем, очищен из природного источника или получен путем пептидного синтеза или методами генной инженерии, или методами химического синтеза. Например, ОКТ3 и UCHL1 можно приобретать у компании ThermoFisher, GeneTex и тому подобных.

[0062]

В случае использования цитокина на этапе (2-3) в качестве цитокина можно упомянуть IL-2 и IL-7, и тому подобное. Если цитокин представляет собой IL-2, его концентрация в среде составляет 10 Ед/мл - 1000 Ед/мл, и если он представляет собой IL-7, его концентрация в среде составляет 1 нг/мл - 1000 нг/мл.

[0063]

На этапе (2-3) температурные условия культивирования не имеют конкретных ограничений. Температура, например, составляет от примерно 37°C до примерно 42°C,

предпочтительно от примерно 37°C до примерно 39°C. Период культивирования могут соответствующим образом определять специалисты в данной области путем мониторинга количества $\gamma\delta$ T-клеток и тому подобного. Число дней культивирования не имеет ограничений при условии, что могут быть получены $\gamma\delta$ T-клетки. Период культивирования составляет, например, не менее 1 дня, не менее 2 дней, не менее 3 дней, не менее 4 дней, не менее 5 дней, предпочтительно не менее 6 дней. Он предпочтительно не превышает 28 дней, более предпочтительно не превышает 14 дней.

[0064]

Популяция CD3-положительных T-клеток, полученная на вышеуказанном этапе, включает $\gamma\delta$ T-клетки и может быть дополнительно сконцентрирована. Этап (2) может дополнительно включать следующий этап (2-4).

[0065]

(2-4) Этап размножения культуры CD3-положительных T-клеток, включающих $\gamma\delta$ T-клетки

Способ размножения культуры CD3-положительных T-клеток не имеет конкретных ограничений при условии, что $\gamma\delta$ T-клетки могут размножаться. Например, можно упомянуть способ культивирования CD3-положительных T-клеток, включающих $\gamma\delta$ T-клетки, в тех же условиях культивирования, что и условия на этапе размножения культуры CD8 α + β + цитотоксических T-клеток, описанные в WO 2016/076415, WO 2018/135646, и тому подобные.

[0066]

В настоящем изобретении среда, используемая для размножения культуры CD3-положительных T-клеток, включающих $\gamma\delta$ T-клетки, не имеет конкретных ограничений. Среду, используемую для культивирования животных клеток, можно готовить из минимальной среды. Минимальная среда может быть аналогичной средам, используемым на вышеописанном этапе (2-3). Среда может содержать сыворотку, или может не содержать сыворотку. 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, α -монотиоглицерин (MTG)), липиды, аминокислоты, L-глутамин, L-аланил-L-глутамин (например, GlutaMax (зарегистрированная торговая марка)), несущественные аминокислоты, витамины, факторы роста, низкомолекулярные соединения, антибиотики (например, пенициллин, стрептомицин), антиоксиданты, пировиноградную кислоту, буферы, неорганические соли, цитокины, гормоны и тому подобное. В одном варианте осуществления настоящего изобретения могут присутствовать витамин С, такой как аскорбиновая кислота и тому подобное, инсулин, трансферрин, соединение селена (например, селенит натрия), цитокин, такой как IL-7, и тому подобное.

[0067]

В случае использования витамина С на этапе (2-4) витамин С может быть таким же, как описанный для этапа (2-1), и может быть добавлен аналогичным образом. В одном

варианте осуществления концентрация витамина С в среде, или культуральной среде, предпочтительно составляет 5 мкг/мл - 200 мкг/мл. В другом варианте осуществления витамин С добавляют в культуральную среду в количестве, соответствующем 5 мкг/мл - 500 мкг/мл (например, количестве, соответствующем 5 мкг/мл, 10 мкг/мл, 25 мкг/мл, 50 мкг/мл, 100 мкг/мл, 200 мкг/мл, 300 мкг/мл, 400 мкг/мл, 500 мкг/мл).

[0068]

На этапе (2-4) среда содержит агонист комплекса CD3/TCR. Агонист комплекса CD3/TCR не имеет конкретных ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную передавать сигнал от комплекса CD3/TCR к CD3-положительной клетке путем специфического связывания с комплексом CD3/TCR. Примеры агонистов комплекса CD3/TCR включают агонист CD3 и/или агонист TCR. В качестве агониста CD3 можно упомянуть анти-CD3 антитело-агонист (для упрощения называемое «анти-CD3 антитело») или его связывающий фрагмент, и в качестве агониста TCR можно упомянуть по меньшей мере одного представителя, выбранного из группы, состоящей из анти-TCR антитела-агониста (также для упрощения называемого «анти-TCR антитело») или его связывающего фрагмента, комплекса МНС/антигенный пептид или его мультимера, а также комплекса МНС/суперантиген или его мультимера. В случае использования анти-CD3 антитела анти-CD3 антитело 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 IgG. В качестве анти-CD3 антитела можно упомянуть антитело (ОКТ3), полученное из клона ОКТ3, антитело (UCHT1), полученное из клона UCHT1, и тому подобное, предпочтительно UCHT1. Концентрация анти-CD3 антитела в среде составляет, например, 0,3 нг/мл - 10000 нг/мл, предпочтительно 50 нг/мл - 5000 нг/мл, более предпочтительно 200 нг/мл - 4000 нг/мл. Вышеуказанный агонист комплекса CD3/TCR может быть приобретен коммерческим путем, очищен из природного источника или получен путем пептидного синтеза или методами генной инженерии, или методами химического синтеза. Например, ОКТ3 и UCHT1 можно приобретать у компании ThermoFisher, GeneTex и тому подобных.

[0069]

На этапе (2-4) в среде предпочтительно присутствует фибронектин или его вариант. Такой фибронектин не имеет конкретных ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную связываться с CD3-положительными клетками. Вариант фибронектина не имеет конкретных ограничений при условии, что он представляет собой молекулу, способную связываться с VLA-5 и VLA-4 на поверхности CD3-положительных клеток, и примеры включают RetroNectin. Фибронектин и его вариант могут присутствовать в среде в любой форме. Например, они могут содержаться в среде в процессе культивирования, или могут быть иммобилизованы на культуральном контейнере, и предпочтительно являются иммобилизованными на культуральном контейнере.

[0070]

Если фибронектин или его вариант содержится в среде, среда может быть такой же,

как среда, содержащая агонист комплекса CD3/TCR. Наличие или отсутствие сыворотки, добавок и тому подобного может быть таким же, как в среде, содержащей агонист комплекса CD3/TCR. Если фибронектин или его вариант содержится в среде, нижний предел концентрации фибронектина или его варианта может составлять не менее 10 нг/мл, предпочтительно не менее 100 нг/мл, и верхний предел может составлять не более 10000 мкг/мл, предпочтительно не более 1000 мкг/мл.

[0071]

На этапе (2-4) среда также предпочтительно содержит агонист CD30. Агонист CD30 не имеет конкретных 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 одного представителя, выбранного из группы, состоящей из анти-CD30 антитела-агониста (также для упрощения называемого «анти-CD30 антитело») или его связывающего фрагмента и лиганда CD30 или его связывающего фрагмента.

[0072]

Подобно агонисту комплекса CD3/TCR, агонист CD30, используемый на этапе (2-4), может присутствовать в любой форме при условии, что он может находиться в контакте с CD30 в процессе культивирования. Например, он может содержаться в среде в процессе культивирования или может быть иммобилизован на культуральном контейнере, и предпочтительно содержится в среде.

[0073]

Если агонист CD30 содержится в среде, среда может быть такой же, как среда, содержащая агонист комплекса CD3/TCR. Наличие или отсутствие сыворотки, добавок и тому подобного может быть таким же, как в среде, содержащей агонист комплекса CD3/TCR. Если агонист CD30 содержится в среде, концентрацию агониста CD30 в среде может соответствующим образом определять специалист в данной области в соответствии с методом определения агониста CD30. Например, если агонист CD30 представляет собой анти-CD30 антитело-агонист или его связывающий фрагмент, концентрация анти-CD30 антитела-агониста или его связывающего фрагмента в среде, как правило, составляет 1 нг/мл - 10000 нг/мл, предпочтительно 30 нг/мл - 300 нг/мл.

[0074]

Если 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 при иммобилизации агониста CD30 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.

[0075]

Если цитокин используют на этапе (2-4), цитокин может представлять собой IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 или тому подобное. Можно использовать цитокин только одного вида или многих видов (предпочтительно всех видов). Если цитокин представляет собой IL-2, его концентрация в среде может составлять 10 Ед/мл - 1000 Ед/мл, если цитокин представляет собой IL-7, его концентрация в среде может составлять 1 нг/мл - 1000 нг/мл. Концентрация IL-12 в среде может составлять 5 нг/мл - 500 нг/мл, концентрация IL-15 в среде может составлять 1 нг/мл - 100 нг/мл, концентрация IL-18 в среде может составлять 5 нг/мл - 500 нг/мл и концентрация IL-21 в среде может составлять 2 нг/мл - 200 нг/мл.

[0076]

На этапе (2-4) в среде в качестве цитокина может содержаться цитокин семейства TNF. Примеры цитокинов семейства TNF включают TNF- α , TNF- β , лимфотоксин α , Fas-лиганд, TRAIL, TWEAK, TL1A, RANK-лиганд, OX40-лиганд, APRIL, AITRL, BAFF, 4-1BBL и CD40-лиганд и тому подобное, и TL1A является предпочтительным. В случае использования TL1A его концентрация в среде может составлять 5 нг/мл - 500 нг/мл, предпочтительно 10 нг/мл - 300 нг/мл, более предпочтительно 20 нг/мл - 200 нг/мл.

[0077]

На этапе (2-4), кроме того, в среде может дополнительно содержаться ингибитор апоптоза. В качестве ингибитора апоптоза можно упомянуть ингибитор протеазы, например, ингибитор каспазы. В качестве ингибитора каспазы предпочтительным является пан-каспазный ингибитор FMK Z-VAD (N-бензилоксикарбонил-Val-Ala-Asp(O-Me) фторметилкетон) (далее в настоящем документе иногда называемый «Z-VAD-FMK»), и его концентрация в среде может составлять 1 мкМ - 1000 мкМ, предпочтительно 1 мкМ - 500 мкМ, более предпочтительно 1 мкМ - 200 мкМ, особенно предпочтительно 1 мкМ - 50 мкМ.

[0078]

В настоящем изобретении полученные $\gamma\delta$ T-клетки могут быть использованы после выделения, или могут быть использованы «как есть» (а именно, в виде клеточной популяции, возможно содержащей клетки другого типа). В случае выделенных клеток выделение можно проводить с использованием по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из γ TCR, δ TCR и CD3, в качестве критерия оценки, и используемый способ выделения может представлять собой способ, хорошо известный специалистам в данной области. Примеры включают, но без ограничения, способ с использованием антитела к γ TCR, δ TCR и CD3 (связанного с магнитными гранулами, и тому подобным, по мере необходимости) и выделение методом проточной цитометрии или методом магнитного разделения клеток, способ очистки с использованием аффинной колонки, на которой иммобилизован нужный антиген, и тому подобное.

При использовании клеток «как есть» относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток в клеточной популяции можно увеличивать, используя способ, хорошо известный специалистам в данной области. Примеры способа увеличения относительного содержания $\gamma\delta$ T-клеток в клеточной популяции включают, но без ограничения, способы, описанные в *Front. Immunol.*, 5:636 (2014), национальной публикации международной патентной заявки

№ 2017-537625, национальной публикации международной патентной заявки № 2003-529363 и тому подобном.

[0079]

Клетки, используемые для способа получения по настоящему изобретению, необязательно, имеют нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенный TCR и/или химерный антигенный рецептор (CAR), каждый из которых узнает и связывает антиген или комплекс антиген-HLA. Таким образом, один вариант осуществления настоящего изобретения может включать этап введения нуклеиновой кислоты, кодирующей вышеупомянутый TCR (то есть, (i) α TCR и β TCR, (ii) γ TCR и δ TCR), и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей (iii) вышеупомянутый CAR, в клетку (например, плюрипотентную стволовую клетку, гемопоэтическую клетку-предшественника и так далее), полученную на любом из (1) этапа получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки, и (2) этапа дифференциации индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной на этапе (1), в T-клетки. Из них, нуклеиновую кислоту, кодирующую (i) α TCR и β TCR, вводят в $\gamma\delta$ T-клетки, полученные на любом из этапов дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в T-клетки. В настоящей спецификации «нуклеиновая кислота, кодирующая TCR» означает нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность оснований, кодирующую одну цепь, образующую TCR, и последовательность оснований, кодирующую другую цепь. «Нуклеиновая кислота, кодирующая TCR» также означает сочетание нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность оснований, кодирующую одну цепь, образующую TCR, и нуклеиновой кислоты, содержащей последовательность оснований, кодирующую другую цепь. То есть, когда нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR ((i) α TCR и β TCR), вводят в клетку, можно вводить одну нуклеиновую кислоту, содержащую как последовательность оснований, кодирующую α TCR, так и последовательность оснований, кодирующую β TCR, или последовательность оснований, кодирующую α TCR, и последовательность оснований, кодирующую β TCR, можно вводить отдельно. В случае отдельного введения эти нуклеиновые кислоты можно вводить одновременно или последовательно. То же применимо и к (ii) γ TCR и δ TCR.

[0080]

TCR, используемый по настоящему изобретению, включает не только рецептор, в котором α -цепь и β -цепь TCR образуют гетеродимер (то есть, $\alpha\beta$ TCR) или γ -цепь и δ -цепь TCR образуют гетеродимер (то есть, $\gamma\delta$ TCR), но также рецептор, в котором они образуют гомодимер. Кроме того, также можно использовать рецептор, лишенный части, или всей, константной области, и рецептор с рекомбинацией аминокислотной последовательности. Из них, $\gamma\delta$ TCR является предпочтительным, и $V\gamma9V\delta2$ TCR является особенно предпочтительным.

[0081]

Константная область вышеупомянутой цепи TCR может представлять собой константную область цепи TCR клона цитотоксического T-лимфоцита (CTL), из которой

она получена, при этом область была подвергнута заданной модификации. Примеры модификации включают, но без ограничения, замену конкретных аминокислотных остатков в константной области TCR клона CTL остатками цистеина, что повышает эффективность экспрессии димера за счет дисульфидной связи между цепями TCR, и тому подобное.

[0082]

Примеры антигена, являющегося мишенью для вышеупомянутого TCR, включают, но без ограничения, опухолевые антигены. Опухолевый антиген может представлять собой опухоль-специфический антиген (ОСА) или опухоль-ассоциированный антиген (ОАА). Конкретные примеры такого опухолевого антигена включают антигены одного или более видов, выбранные из группы, состоящей из дифференцировочных антигенов, таких как MART-1/MelanA (MART-I), gp100 (Pmel 17), тирозиназа, TRP-1, TRP-2 и тому подобное, опухоль-специфических мультилинейных антигенов, таких как WT1, глипикан-3, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15 и тому подобное, эмбриональных антигенов, таких как СЕА и тому подобное, избыточно экспрессированных опухолевых генов или мутантных опухоль-подавляющих генов, таких как p53, Ras, HER-2/neu и тому подобное, уникальных опухолевых антигенов, возникающих в результате хромосомной транслокации, таких как BCR-ABL, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR и тому подобное, и вирусных антигенов, таких как антиген EBVA вируса Эпштейна-Барр, антигены Е6 и Е7 вируса папилломы человека (HPV) и тому подобное. В качестве других опухолевых антигенов можно упомянуть TSP-180, MAGE-4, MAGE-5, MAGE-6, RAGE, NY-ESO, p185erbB2, p180erbB-3, c-met, nm-23H1, PSA, TAG-72, CA 19-9, CA 72-4, CAM 17,1, NuMa, K-ras, β -катенин, CDK4, Mum-1, p 15, p 16, 43-9F, 5T4, 791Tgp72, α -фетопроtein, β -HCG, BSA225, 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.

[0083]

Как показано в Примере, описанном ниже, в одном варианте осуществления среди $\gamma\delta$ T-клеток, полученных способом получения по настоящему изобретению, клетки, экспрессирующие химерный антигенный рецептор (CAR), продемонстрировали цитотоксическую активность, специфическую в отношении клеток, экспрессирующих антиген-мишень CAR, и противоопухолевую активность (в настоящей спецификации также упрощенно называемую «цитотоксическая активность»). Таким образом, с точки зрения антиген-специфической цитотоксической активности, $\gamma\delta$ T-клетки, полученные способом получения по настоящему изобретению, предпочтительно экспрессируют CAR. Обладает ли клетка цитотоксической активностью, можно определять известным методом, и предпочтительный метод включает, например, метод измерения цитотоксической активности в отношении клеток, экспрессирующих антиген-мишень CAR, в анализе высвобождения хрома или тому подобном.

[0084]

В настоящем изобретении термин «химерный антигенный рецептор (CAR)» означает слитый белок, содержащий антигенсвязывающий домен, трансмембранный домен и внутриклеточный домен сигнальной трансдукции. Антигенсвязывающий домен CAR включает антитело с короткой цепью (scFv), в котором легкая цепь (VL) и тяжелая цепь (VH) варибельной области антитела связаны в тандем через спейсер, такой как линкер (например, линкер, состоящий из G и S (линкер GS) (например, GGGGS, GGGGS, или линкер, объединяющий их (например, SEQ ID NO: 4 или 5 и так далее) и тому подобное)). $\gamma\delta$ -клетки, экспрессирующие CAR, узнают антиген в области scFv, а затем сигнал узнавания от нее передается в T-клетки через внутриклеточный домен сигнальной трансдукции. Введение CAR в $\gamma\delta$ -клетки позволяет придавать специфичность в отношении интересующего антигена. Кроме того, поскольку CAR может напрямую узнавать молекулы антигена независимо от HLA класса I или класса II, сильный иммунный ответ также может быть индуцирован против клеток с пониженной экспрессией генов HLA класса I или класса II. В качестве антигена, являющегося мишенью вышеупомянутого CAR, можно упомянуть те же антигены, что и вышеупомянутые антигены, являющиеся мишенью вышеупомянутого TCR.

[0085]

Примеры трансмембранного домена CAR включают, но без ограничения, трансмембранные домены, полученные из одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из α -цепи, β -цепи или ζ -цепи TCR, ϵ -цепи CD3, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, 4-1BB(CD137) и CD154, и тому подобные. Можно использовать трансмембранный домен молекулы, из которой получен первый внутриклеточный домен сигнальной трансдукции, связанный с антигенсвязывающим доменом. Например, если молекула, из которой получен первый внутриклеточный домен сигнальной трансдукции, связанный с антигенсвязывающим доменом, представляет собой CD28, трансмембранный домен также может быть получен из CD28. Альтернативно, также можно использовать искусственно созданный трансмембранный домен.

[0086]

Примеры внутриклеточного домена сигнальной трансдукции CAR включают, но без ограничения, внутриклеточные домены, полученные из одного или более белков, выбранных из группы, состоящей из ζ -цепи CD3 (ζ -цепи TCR), γ -цепи FcR, β -цепи FcR, γ -цепи CD3, δ -цепи CD3, ϵ -цепи CD3, CD5, CD22, CD79a, CD79b и CD66d. Из них, внутриклеточный домен сигнальной трансдукции, полученный из ζ -цепи CD3, является предпочтительным. Внутриклеточный домен сигнальной трансдукции может дополнительно содержать внутриклеточный домен костимулирующей молекулы. Примеры костимулирующей молекулы включают внутриклеточные домены белков одного или более видов, выбранных из группы, состоящей из CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-ассоциированного антигена лимфоцитов 1 (LFA-1),

CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3 и CD83. Силу и продолжительность активности CAR можно контролировать путем выбора типа и числа связываемых костимулирующих молекул (например, Mol Ther. 2009; 17:1453-1464).

[0087]

Между антигенсвязывающим доменом и трансмембранным доменом CAR, или между внутриклеточным доменом трансдукции и трансмембранным доменом CAR, может быть встроен спейсер. В качестве спейсера можно использовать пептид, как правило, состоящий из не более чем 300 аминокислот, предпочтительно 10-100 аминокислот, наиболее предпочтительно 25-50 аминокислот. Конкретные примеры включают, но без ограничения, пептиды, содержащие шарнирную область из IgG1 и область CH2CH3 иммуноглобулина, а также часть CD3, и тому подобные.

[0088]

Примеры конкретных CAR включают, но без ограничения, CAR первого поколения, в которых scFv и ζ -цепь CD3 связаны через спейсер, CAR второго поколения, в которых трансмембранный домен, полученный из CD28, и внутриклеточный домен встроены между scFv и ζ -цепью CD3 CAR первого поколения для повышения способности к активации Т-клеток, и CAR третьего поколения, в которых внутриклеточный домен костимулирующей молекулы (4-1BB или OX40), отличной от CD28, встроены между внутриклеточным доменом CD28 и ζ -цепью CD3 CAR второго поколения.

[0089]

Более конкретные примеры CAR, используемых по настоящему изобретению, включают химерный антигенный рецептор, содержащий scFv, узнающий CD19, в качестве антигенсвязывающего домена, трансмембранный домен CD8 в качестве трансмембранного домена, внутриклеточный домен, полученный из CD28, в качестве внутриклеточного домена сигнальной трансдукции, внутриклеточный домен, полученный из CD30, внутриклеточный домен, полученный из 4-1BB, и внутриклеточный домен, полученный из ζ -цепи CD3. Порядок вышеупомянутых внутриклеточных доменов, содержащихся во внутриклеточном домене сигнальной трансдукции, не имеет конкретных ограничений и, например, принят следующий порядок: внутриклеточный домен, полученный из CD28, внутриклеточный домен, полученный из CD30, или внутриклеточный домен, полученный из 4-1BB, и внутриклеточный домен, полученный из ζ -цепи CD3. Более конкретно, химерный антигенный рецептор по настоящему изобретению состоит из, например, аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 или 2, или аминокислотной последовательности, полученной путем замены, делеции, добавления и/или вставки одной или двух, или более (предпочтительно, примерно 1-100, предпочтительно примерно 1-50, более предпочтительно примерно 1-10, особенно предпочтительно 1 - несколько (2, 3, 4 или 5)) аминокислот в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1 или 2.

[0090]

Примеры внутриклеточного домена, полученного из CD30, включают

аминокислотную последовательность, полученную путем замены, делеции, добавления и/или вставки одной или двух, или более (предпочтительно, примерно 1-100, предпочтительно примерно 1-50, более предпочтительно примерно 1-10, особенно предпочтительно 1 - несколько (2, 3, 4 или 5)) аминокислот в аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Если в аминокислотной последовательности имеет место замена, делеция, добавление и/или вставка, как описано выше, местонахождение замены, делеции, добавления и/или вставки не имеет конкретных ограничений при условии, что функция внутриклеточного домена CD30 сохраняется.

[0091]

Можно подтверждать известным способом, что вышеупомянутый TCR и/или CAR (далее в настоящем документе иногда сокращенно называемые «TCR и так далее») специфически узнает антиген и может связывать его. Подходящий способ включает, например, декстрамерный анализ, анализ ELISPOT и тому подобное. Путем проведения анализа ELISPOT можно подтверждать, что Т-клетки, экспрессирующие TCR на клеточной поверхности, узнают антиген-мишень за счет TCR и так далее, и его сигнал передается в клетки.

[0092]

Кроме того, авторы настоящего изобретения установили, что цитотоксическая активность возрастает в клетках, экспрессирующих слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α (далее в настоящем документе иногда сокращенно называемые «IL-15/IL-15R α »), совместно с вышеупомянутым CAR, в сравнении с клетками, экспрессирующими только CAR. Таким образом, с точки зрения цитотоксической активности $\gamma\delta$ Т-клетки, полученные способом получения по настоящему изобретению, предпочтительно экспрессируют IL-15/IL-15R α , и более предпочтительно, экспрессируют вышеупомянутый CAR. Таким образом, для получения $\gamma\delta$ Т-клеток, экспрессирующих IL-15/IL-15R α , способ получения по настоящему изобретению может включать этап введения нуклеиновой кислоты, кодирующей IL-15/IL-15R α , в клетки, полученные на любом из этапов (1) и (2) вышеупомянутого способа по п. 1. (Например, CD3-положительные Т-клетки, полученные на этапе (2-2), CD3-положительные Т-клетки, сконцентрированные на этапе (2-3), и тому подобное).

[0093]

В системе сигнальной трансдукции IL-15 IL-15R α , экспрессируемый на антигенпредставляющих клетках, как правило, связывает IL-15, и IL-15 представляется рецептору IL-15, состоящему из IL-15R β и общей γ -цепи (γ c), на CD8-положительной и CD4-отрицательной клетке (транс-представление), за счет чего поддерживается цитотоксическая активность CD8-положительной CD4-отрицательной клетки. Таким образом, когда CD3-положительная клетка, экспрессирующая IL-15/IL-15R α , является CD8-положительной CD4-отрицательной, клетка может передавать сигнал IL-15 в собственную клетку через рецептор IL-15. Альтернативно, CD3-положительная клетка, экспрессирующая IL-15/IL-15R α , может передавать сигнал IL-15 в другие CD8-

положительные CD4-отрицательные клетки через рецептор IL-15. Как описано выше, поскольку IL-15/IL-15R α может поддерживать цитотоксическую активность CD8-положительной CD4-отрицательной клетки, ожидается, что будет иметь место постоянный цитотоксический эффект на клетки, являющиеся мишенью для CAR.

[0094]

IL-15/IL-15R α может представлять собой белок трансмембранного типа или секретируемый белок. Известно, что в IL-15R α IL-15-связывающий домен из 1-65 аминокислот с N-конца зрелого белка представляет собой область, ответственную за связывание с IL-15 (Wei X. *et al.*, J. Immunol., 167: 277-282, 2001). Таким образом, белок трансмембранного типа может представлять собой белок, который сохраняет IL-15-связывающий домен и сохраняет трансмембранный домен IL-15R α . С другой стороны, секретируемый белок может представлять собой белок, который сохраняет IL-15-связывающий домен и лишен трансмембранного домена IL-15R α (например, белок, состоящий из 1-65 аминокислотных остатков, 1-85 аминокислотных остатков или 1-182 аминокислотных остатков IL-15R α , пептид, содержащий аминокислотную последовательность с не менее чем 85% идентичностью с аминокислотной последовательностью, и тому подобное).

[0095]

Между IL-15 и IL-15R α в IL-15/IL-15R α может быть встроен спейсер. В качестве спейсера может быть использован пептид, как правило, состоящий из не более чем 300 аминокислот, предпочтительно 10-100 аминокислот, наиболее предпочтительно 20-50 аминокислот. Конкретные примеры включают, но без ограничения, вышеупомянутый линкер GS и тому подобное.

[0096]

IL-15/IL-15R α не имеет конкретных ограничений при условии, что он представляет собой белок, в котором слиты вместе IL-15 и IL-15R α , и конкретные примеры включают пептид, состоящий из SEQ ID NO: 6. При том, что IL-15/IL-15R α не имеет конкретных ограничений при условии, что он может связывать рецептор IL-15 и передавать сигнал IL-15 в клетку, можно упомянуть, например, пептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую гомологию или идентичность 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 документе термин «гомология», или «идентичность», означает относительное содержание (%) одной и той же аминокислоты и аналогичного аминокислотного остатка (одних и тех же аминокислотных остатков в случае идентичности) среди всех перекрывающихся аминокислотных остатков при оптимальном выравнивании, когда две аминокислотные последовательности выровнены с использованием математического алгоритма, известного в соответствующей области техники (предпочтительно, алгоритм является таким, что разрыв может быть внесен в одну

или обе из последовательностей для оптимального выравнивания). Термин «аналогичная аминокислота» означает аминокислоты, имеющие аналогичные физико-химические свойства, и можно упомянуть, например, аминокислоты, отнесенные к одной и той же группе, например, 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, имеющие гидроксильную группу (Ser, Thr), аминокислоты, имеющие небольшую боковую цепь (Gly, Ala, Ser, Thr, Met), и тому подобное. Считается, что замена такими аналогичными аминокислотами не приводит к изменению фенотипа белка (то есть, имеет место консервативная аминокислотная замена). Конкретные примеры консервативной аминокислотной замены хорошо известны в данной области и описаны в различных документах (например, Bowie *et al.*, Science, 247: 1306-1310 (1990)). Гомологию или идентичность аминокислотной последовательности в настоящей спецификации можно рассчитывать, используя алгоритм расчета гомологий BLAST NCBI (Базовый инструментальный поиск локальных блоков от Национального центра биотехнологической информации), и в следующих условиях (ожидание=10; пробелы допустимы; матрица=BLOSUM62; фильтрация=ВЫКЛ.).

[0097]

Используемый в настоящем документе термин «способные связывать» означает «имеющие способность к связыванию» и относится к способности образовывать нековалентный комплекс с одной или более другими молекулами. Различные методы и анализы для определения способности к связыванию известны в данной области. Связывание, как правило, представляет собой связывание с высокой аффинностью, при этом аффинность, измеренная в виде величины KD, предпочтительно составляет менее 1 мкМ, более предпочтительно менее 100 нМ, даже более предпочтительно менее 10 нМ, даже более предпочтительно менее 1 нМ, даже более предпочтительно менее 100 пМ, даже более предпочтительно менее 10 пМ, даже более предпочтительно менее 1 пМ. Термин «KD», или «значение KD», означает равновесную константу диссоциации, как известно в данной области.

[0098]

Вышеупомянутые TCR и так далее, вводят в клетки в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR и так далее. Кроме того, слитый белок, включающий IL-15 и IL-15 α , также вводят в клетку в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК или РНК, или химеру ДНК/РНК, и предпочтительно представляет собой ДНК. Кроме того, нуклеиновая кислота может быть двухцепочечной или одноцепочечной. В случае двух цепей можно использовать двухцепочечную ДНК, двухцепочечную РНК или гибрид ДНК:РНК. Если нуклеиновая кислота представляет собой РНК, Т соответствует U в последовательности РНК. Кроме того, нуклеиновая кислота может содержать природный нуклеотид, модифицированный нуклеотид, нуклеотидный аналог, или их смесь, при условии, что она способна

экспрессировать полипептид *in vitro* или в клетке.

[0099]

Вышеупомянутая нуклеиновая кислота может быть сконструирована способом, известным как таковой. Например, на основании аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности известного TCR или CAR химически синтезируют цепь ДНК, или синтезированные частично перекрывающиеся короткие цепи олигонуклеотидов ДНК соединяют методом ПЦР или методом сборки Гибсона, в результате чего может быть сконструирована ДНК, кодирующая полноразмерный, или частичный, TCR или CAR. Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α , также может быть сконструирована аналогичным образом.

[0100]

Вышеупомянутая нуклеиновая кислота может быть вставлена в экспрессионный вектор. Вектор может представлять собой вектор, который встраивается, или не встраивается, в геном клетки-мишени. В одном варианте осуществления вектор, который не встраивается в геном, способен реплицироваться за пределами генома клетки-мишени. Вектор может присутствовать во множестве копий за пределами генома клетки-мишени. В другом варианте осуществления изобретения вектор встраивается в геном клетки-мишени. В предпочтительных вариантах осуществления вектор встраивается в заданный участок генома клетки-мишени.

[0101]

Примеры промотора, используемого в вышеупомянутом векторе, включают промотор EF1 α , промотор CAG, промотор SR α , промотор SV40, промотор LTR, промотор CMV (цитомегаловируса), промотор RSV (вируса саркомы Рауса), LTR MoMuLV (вируса лейкоза мышей Молони), промотор HSV-TK (тимидинкиназы вируса простого герпеса), промотор гена TCR V α , промотор гена TCR V β и тому подобное. Из них, промотор EF1 α , промотор CAG, LTR MoMuLV, промотор CMV, промотор SR α и тому подобное, являются предпочтительными.

[0102]

Вышеупомянутый вектор может содержать регуляторную последовательность транскрипции и трансляции, сайт связывания рибосомы, энхансер, точку начала репликации, сигнал добавления полиА, ген селективного маркера и тому подобное, по мере необходимости, помимо вышеупомянутых промоторов. Примеры гена селективного маркера включают ген дигидрофолатредуктазы, ген устойчивости к неомицину, ген устойчивости к пурамицину и тому подобное.

[0103]

В одном варианте осуществления настоящего изобретения гетеродимеры из α -цепи и β -цепи TCR могут быть сформированы в клетке-мишени и на клеточной поверхности путем введения экспрессионного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую α -цепь TCR, и нуклеиновую кислоту, кодирующую β -цепь TCR, в клетку-мишень. В этом случае нуклеиновая кислота, кодирующая α -цепь TCR, и нуклеиновая

кислота, кодирующая β -цепь TCR, могут быть встроены в отдельные экспрессионные векторы или в один экспрессионный вектор. Если они встроены в один экспрессионный вектор, эти нуклеиновые кислоты двух видов, предпочтительно, встроены через последовательность, делающую возможной полицистронную экспрессию. В случае использования последовательности, делающей возможной полицистронную экспрессию, множество генов, встроенных в экспрессионный вектор одного типа, могут экспрессироваться более эффективно. Примеры последовательности, делающей возможной полицистронную экспрессию, включают последовательность 2A (например, полученную из вируса ящура (FMDV) последовательность 2A (F2A), полученную из вируса ринита лошадей А (ERAV) последовательность 2A (E2A), полученную из свиного тешовируса (PTV-1) последовательность 2A (P2A), полученную из вируса *Thosea asigna* (TaV) последовательность 2A (последовательность T2A) (PLoS ONE3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007)), внутренний участок связывания рибосомы (IRES) (патент США № 4937190) и тому подобное. С точки зрения единообразия уровней экспрессии последовательность P2A и последовательность T2A являются предпочтительными. То же применимо к случаю использования экспрессионного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую γ -цепь TCR, и нуклеиновую кислоту, кодирующую δ -цепь TCR.

[0104]

Вышеупомянутый экспрессионный вектор не имеет конкретных ограничений при условии, что он может экспрессировать TCR и так далее, в течение периода времени, достаточного для предотвращения или лечения заболевания, при введении его в клетку. Примеры включают вирусный вектор, плазмидный вектор и тому подобное. В качестве вирусного вектора можно упомянуть ретровирусный вектор (включая лентивирусный вектор и вектор псевдотипа), аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный вектор, герпесвирусный вектор, вирус Сендай, эписомный вектор и тому подобное. Также можно использовать транспозонную систему экспрессии (систему PiggyBac). В качестве плазмидного вектора можно упомянуть плазмиду, экспрессируемую в животных клетках (например, p α 1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pсDNA1/Neo), и тому подобное.

[0105]

Способ введения вышеупомянутой нуклеиновой кислоты или вектора в клетки не имеет конкретных ограничений, и можно использовать известные способы. В случае введения нуклеиновой кислоты и плазмидного вектора можно использовать способ, аналогичный способу, описанному для этапа вышеупомянутого способа 1 (1). Альтернативно, вышеупомянутую нуклеиновую кислоту можно вводить в геном клетки методом редактирования генома (например, с использованием системы CRISPR, TALEN, ZFN и тому подобного).

[0106]

Вышеупомянутую нуклеиновую кислоту также можно непосредственно вводить в клетки в форме РНК и использовать для экспрессии TCR и так далее, в клетках. В качестве метода введения РНК можно использовать известный метод и, например, предпочтительно

можно использовать метод липофекции, метод электропорации или тому подобное.

[0107]

На вышеупомянутых этапах (1) и (2) время введения вышеупомянутой нуклеиновой кислоты не имеет конкретных ограничений при условии, что TCR и так далее, введенные в $\gamma\delta$ T-клетки, могут экспрессироваться. Например, нуклеиновую кислоту можно вводить на стадии иПС клеток, ГКП ($CD34^+/CD43^+$), проТ-клеток ($CD4^+/CD8^-$), $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ Т-клеток, $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ Т-клеток или других клеток (например, $CD3^+/CD4^+/CD8^+$ клеток и так далее).

[0108]

Когда вышеупомянутую нуклеиновую кислоту вводят в клетки, экспрессию эндогенной цепи TCR, обычно экспрессируемой клетками, предпочтительно подавляют при помощи киРНК для увеличения экспрессии введенного TCR, подавления возникновения неправильно спаренного TCR и подавления не самореактивности. Когда вышеупомянутую нуклеиновую кислоту используют в данном способе, во избежание влияния киРНК на TCR предпочтительно, если последовательность оснований нуклеиновой кислоты, кодирующей TCR, представляет собой последовательность (кодон-конверсионного типа последовательность), отличающуюся от последовательности оснований, соответствующей РНК, на которую действует киРНК, подавляющая экспрессию эндогенной цепи TCR. Эти способы описаны, например, в WO 2008/153029. Вышеупомянутая последовательность оснований может быть получена путем введения молчащей мутации в нуклеиновую кислоту, кодирующую TCR, полученную естественным образом или искусственно сконструированную путем химического синтеза нуклеиновую кислоту. Во избежание неправильного спаривания с эндогенной цепью TCR часть, или все, из константных областей нуклеиновой кислоты, кодирующей введенный TCR, также могут быть заменены константной областью, полученной от животного, отличного от человека, такого как мышь.

[0109]

2. $\gamma\delta$ T-клетки или клеточная популяция, содержащая $\gamma\delta$ T-клетки

Настоящее изобретение также относится к $\gamma\delta$ T-клетке, или клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ T-клетки, при этом $\gamma\delta$ T-клетка представляет собой клетку, дифференцированную из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки. Относительное содержание $\gamma\delta$ T-клеток, содержащихся в вышеупомянутой клеточной популяции (число $\gamma\delta$ T-клеток, содержащихся в клеточной популяции/общее число клеток, содержащихся в клеточной популяции), предпочтительно составляет не менее 90% (например, не менее 90%, не менее 95%, не менее 96%, не менее 97%, не менее 98%, не менее 99% или 100%). Такая клеточная популяция может быть получена, например, способом получения по настоящему изобретению. Относительное содержание рассчитывают путем измерения относительного содержания клеток, экспрессирующих γ TCR, δ TCR и CD3, методом проточной цитометрии. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к $\gamma\delta$ T-клеткам,

полученным способом получения по настоящему изобретению, и/или к клеточной популяции, содержащей $\gamma\delta$ T-клетки. Вышеупомянутые $\gamma\delta$ T-клетки могут содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую экзогенный TCR, нуклеиновую кислоту, кодирующую CAR, и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α , которые описаны в вышеупомянутом п. 1. Далее упомянутые $\gamma\delta$ T-клетки, или клеточную популяцию, содержащую $\gamma\delta$ T-клетки, коллективно называют «клетка и так далее по настоящему изобретению».

[0110]

3. Лекарственный препарат, содержащий клетку и так далее по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к лекарственному препарату, содержащему клетку и так далее по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента (далее в настоящем документе иногда называемому «лекарственный препарат по настоящему изобретению»). Клетка и так далее по настоящему изобретению может проявлять цитотоксическую активность в отношении раковой клетки, раковой стволовой клетки, клетки опухоли и тому подобного. Таким образом, лекарственный препарат, содержащий клетку и так далее по настоящему изобретению, может быть использован для профилактики или лечения опухоли, такой как рак, и может быть введен, например, млекопитающим (например, мыши, крысе, хомяку, кролику, кошке, собаке, корове, овце, обезьяне, человеку), предпочтительно человеку. Таким образом, в одном варианте осуществления настоящего изобретения предложена клетка и так далее по настоящему изобретению для применения в профилактике или лечении опухоли. Кроме того, предложен способ предотвращения или лечения опухоли, включающий введение клетки и так далее по настоящему изобретению, предпочтительно в форме лекарственного препарата, содержащего клетку, и тому подобного.

[0111]

Предотвращение или лечение такой опухоли, как рак, лекарственным препаратом по настоящему изобретению или клеткой и так далее по настоящему изобретению описано, например, в публикации Daniel Baumhoer *et al.*, Am J. Clin Pathol, 2008, 129, 899-906 и тому подобном. Опухоль включает доброкачественную опухоль, злокачественную опухоль (также называемую «рак») и опухоль, которая может быть диагностирована или определена как доброкачественная или злокачественная. Конкретные примеры опухоли включают, но без ограничения, рак печени (например, гепатому), рак яичника (например, светлоклеточную аденокарциному яичника), детский рак, рак легкого (например, плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого), рак яичка (например, несеминомную опухоль половых клеток), опухоль мягких тканей (например, липосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому), рак тела матки (например, интраэпителиальную опухоль шейки матки, плоскоклеточную карциному шейки матки), меланому, опухоль надпочечников (например, аденому надпочечников), опухоль из нервных клеток (например, шванному), рак желудка (например, аденокарциному желудка),

рак почки (например, опухоль Гравитца), рак молочной железы (например, инвазивную лобулярную карциному, рак слизистой оболочки), рак щитовидной железы (например, медуллярный рак), рак гортани (например, плоскоклеточную карциному), рак мочевого пузыря (например, инвазивную переходно-клеточную карциному) и тому подобное.

[0112]

Клетки, содержащиеся в лекарственном препарате по настоящему изобретению, можно культивировать и/или стимулировать с использованием соответствующей среды и/или стимулирующей молекулы перед введением субъекту. Примеры стимулирующей молекулы включают, но без ограничения, цитокины, соответствующий белок, другие компоненты и тому подобное. Примеры цитокинов включают ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-12, ИЛ-15, IFN- γ и тому подобное, и предпочтительно можно использовать ИЛ-2. При том, что концентрация ИЛ-2 в среде не имеет конкретных ограничений, например, она предпочтительно составляет 0,01 Ед/мл - 1×10^5 Ед/мл, более предпочтительно 1 Ед/мл - 1×10^4 Ед/мл. Примеры соответствующего белка включают лиганд CD3, лиганд CD28 и анти-ИЛ-4 антитело. Кроме них, также можно добавлять лимфоцит-стимулирующий фактор, такой как лектин, и тому подобное. Кроме того, в среду можно добавлять сыворотку или плазму. При том, что добавленное в эту среду количество не имеет конкретных ограничений, можно упомянуть диапазон 0% по объему - 20% по объему. Кроме того, используемое количество сыворотки или плазмы может быть изменено в зависимости от стадии культивирования. Например, концентрацию сыворотки или плазмы можно поэтапно уменьшать. По происхождению сыворотка или плазма может быть либо аутологичной, либо аллогенной, и аутологичная является предпочтительной с точки зрения безопасности.

[0113]

Лекарственный препарат по настоящему изобретению предпочтительно используют путем парентерального введения субъекту. Примеры способа парентерального введения включают внутривенное, внутриартериальное, внутримышечное, внутрибрюшинное и подкожное введение, и тому подобное. При том, что дозу соответствующим образом выбирают в зависимости от состояния, массы тела, возраста, и тому подобного, субъекта, лекарственный препарат, как правило, вводят так, что количество клеток, как правило, составляет 1×10^6 - 1×10^{10} клеток, предпочтительно 1×10^7 - 1×10^9 клеток, более предпочтительно 5×10^7 - 5×10^8 клеток, на каждую дозу субъекту с массой тела 60 кг. Лекарственный препарат можно вводить один раз или в виде множества разделенных доз. Лекарственный препарат по настоящему изобретению может быть сформулирован в известную форму, подходящую для парентерального введения, такую как, например, инъекция или инъекционное средство. Лекарственный препарат по настоящему изобретению может содержать фармакологически приемлемые эксципиенты по мере необходимости. Лекарственный препарат по настоящему изобретению может содержать солевой раствор, фосфатно-солевой буфер (PBS), среду и тому подобное для поддержания стабильности клеток. Среда не имеет конкретных ограничений, и примеры включают, но без ограничения, такую среду как RPMI, AIM-V, X-VIVO10 и тому подобное.

Лекарственный препарат может содержать фармацевтически приемлемый носитель (например, человеческий сывороточный альбумин), консервант и тому подобное для целей стабилизации.

[0114]

Кроме того, поскольку клетка и так далее по настоящему изобретению может уничтожать клетки, экспрессирующие антиген-мишень, такой как вышеупомянутый опухолевый антиген и тому подобное, ее можно использовать в качестве средства уничтожения для клеток (например, раковых клеток, раковых стволовых клеток, клеток опухоли и так далее), экспрессирующих антиген. Такое средство уничтожения может быть получено и использовано таким же образом, как и вышеупомянутый лекарственный препарат.

[0115]

Настоящее изобретение также включает варианты осуществления с использованием клетки и так далее по настоящему изобретению в производстве профилактических или терапевтических средств для опухоли, соответствующих лекарственному препарату, содержащему клетку и так далее по настоящему изобретению. Профилактические или терапевтические средства для опухоли могут быть получены способом, известным как таковой. Например, они могут быть изготовлены в известной форме, подходящей для парентерального введения, такой как инъекция, инъекционное средство или тому подобное, как в вышеупомянутом способе получения лекарственного препарата по настоящему изобретению.

[0116]

Настоящее изобретение более конкретно объяснено с помощью следующих Примеров. Объем настоящего изобретения не ограничен данными Примерами.

ПРИМЕРЫ

[0117]

Пример 1. Изучение способа получения клетки, экспрессирующей $\gamma\delta$ TCR

В качестве клеточной популяции, содержащей гемопоэтические клетки-предшественники, использовали популяцию суспендированных клеток, дифференцированных из иПС клеток (линия Ff-I01s04: полученная из мононуклеарных клеток периферической крови здорового человека), предоставленную Центром исследования и применения иПС клеток, Университета Киото, известным способом (например, способами, описанными в публикации Cell Reports 2(2012)1722-1735 и WO 2017/221975). Конкретно, клетки линии Ff-I01s04 высевали при плотности 3×10^5 клеток/лунку (день 0) в обработанный для ультранизкой адгезии 6-луночный планшет, 10 нг/мл BMP4, 50 нг/мл bFGF, 15 нг/мл VEGF, 2 мкМ SB431542 добавляли к среде EB (StemPro34, содержащей 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия, 2 мМ L-глутамин, 45 мМ α -монотиоглицерин и 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты), и клетки культивировали в течение 5 дней в условиях низкого содержания кислорода (5% O₂) (день 5). Затем добавляли 50 нг/мл SCF,

30 нг/мл TPO, 10 нг/мл FLT-3L, и клетки культивировали в течение 5-9 дней (- день 14), получая популяцию суспендированных клеток. Во время периода культивирования среду заменяли каждые два или три дня. Вышеупомянутую популяцию суспендированных клеток, содержащую ГКП, окрашивали с использованием следующего набора антител.

[0118]

Таблица 1

анти-CD34 антитело	Abcam PE/Cy7
анти-CD43 антитело	BD APC
анти-CD45 антитело	BioLegend BV510
анти-CD14 антитело	BioLegend APC/eFluor780
анти-CD235a антитело	BD FITC

[0119]

Клеточные популяции после вышеупомянутого окрашивания подвергали сортировке с использованием FACS Aria. Проводили дифференцирование полученных фракций клеток в лимфоидные клетки известным методом (например, методами, описанными в Journal of Leukocyte Biology 96(2016)1165-1175 и WO 2017/221975). Конкретно, популяцию гемопоэтических клеток-предшественников высевали при плотности 2000 клеток/лунку в 48-луночный планшет, покрытый рекомбинантным химерным белком h-DLL4/Fc (Sino Biological) и RetroNectin (Takara Bio Inc.), и культивировали в условиях 5% CO₂, 37°C. Во время периода культивирования среду меняли каждые два или три дня. В качестве среды использовали среду αMEM с добавлением 15% ЭБС, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина, 55 мкМ 2-меркаптоэтанола, 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия, 50 нг/мл SCF, 50 нг/мл IL-7, 50 нг/мл FLT-3L, 100 нг/мл TPO, 15 мкМ SB203580, 30 нг/мл SDF-1α. Клетки пересеивали в покрытый аналогичным образом 48-луночный планшет в день 7 и день 14 от начала культивирования. Все клетки собирали в день 21 от начала культивирования (день 35), и наличие CD45(+), CD3(+) фракций подтверждали при помощи проточного цитометра (BD FACS Aria™ Fusion, производства BD Biosciences). Полученные клетки высевали в 24-луночный планшет и культивировали в условиях 5% CO₂, 37°C. В качестве среды использовали среду αMEM с добавлением 15% ЭБС, 2 mM L-глутамин, 100 Ед/мл пенициллина, 100 нг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл 2-фосфата аскорбиновой кислоты, 10 мкг/мл человеческого инсулина, 5,5 мкг/мл человеческого трансферрина, 5 нг/мл селенита натрия, 500 нг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ3), 10 нМ дексаметазона (Fuji Pharma: 10171-Н02Н), 100 Ед/мл IL-2, 10 нг/мл IL-7. Все клетки собирали в день 27 от начала культивирования (день 41), клетки подсчитывали при помощи гемоцитометра и окрашивали с использованием следующего набора антител.

[0120]

Таблица 2

V δ 1 Myltenyi FITC
V δ 2 Myltenyi APC
$\gamma\delta$ TCR BD BV510
CD3 BioLegend APC/Cy7
$\alpha\beta$ TCR eBioscience FITC

[0121]

В результате окрашивания было установлено, что клетка, экспрессирующая $\gamma\delta$ TCR ($\gamma\delta$ TCR-положительная клетка), может быть получена из гемопоэтической клетки-предшественника, полученной из иПС клетки (линии Ff-I01s04) (Фиг. 1).

[0122]

Кроме того, поскольку $\gamma\delta$ TCR-положительные клетки включают V δ 1-положительные $\gamma\delta$ T-клетки и V δ 2-положительные $\gamma\delta$ T-клетки, было показано, что могут быть получены $\gamma\delta$ T-клетки типа V δ 1 и типа V δ 2 (Фиг. 2).

[0123]

Пример 2. Изучение цитотоксической активности $\gamma\delta$ T-клетки

Оценивали цитотоксическую активность $\gamma\delta$ T-клетки, происходящей из иПС клетки (линии Ff-I01s04) и полученной в Примере 1. Используя в качестве мишени линию клеток NCI-H226 мезотелиомы проводили реакцию с реагентом DELFIA BATDA (Perkin Elmer) при 37°C в течение 30 мин. Реакционную смесь промывали, клеточную популяцию $\gamma\delta$ T-клеток, полученных из иПС клеток (линии Ff-I01s04) и включающих V δ 1-положительные $\gamma\delta$ T-клетки и V δ 2-положительные $\gamma\delta$ T-клетки, смешивали в 0,5, 1, 2, 4, 8, 16-кратной пропорции относительно клеток-мишеней. Цитотоксическую активность $\gamma\delta$ T-клеток, полученных из иПС клеток (линии Ff-I01s04), оценивали на основании гибели клеток-мишеней через 2 часа.

[0124]

В результате данной оценки было показано, что $\gamma\delta$ T-клетки, полученные из иПС клеток (линии Ff-I01s04), обладают цитотоксической активностью в отношении клеток опухолевой линии NCI-H226 (Фиг. 3).

[0125]

Размножение культуры и оценка функции $i\gamma\delta$ T-клеток

Пример 3. Получение $i\gamma\delta$ T-клеток

Тем же способом, что и способ Примера 1, за исключением того, что использовали UCHT1 (производства GeneTex) в качестве анти-CD3 антитела, были получены $i\gamma\delta$ T-клетки ($i\gamma\delta$ T-клетки), происходящие из иПС клеток (линии Ff-I01s04).

[0126]

Пример 4. Размножение культуры $i\gamma\delta$ T-клеток

$i\gamma\delta$ T-клетки, полученные в Примере 3, суспендировали при плотности 2000000 клеток/мл в среде α -MEM, содержащей 15% ЭБС и дополнительно содержащей цитокин из Таблицы 3, высевали на планшет, покрытый анти-CD3 антителом (UCHT1) и RetroNectin, и

культивировали в условиях 5% CO₂/37°C в течение 3 дней. В 3-й день культивирования клетки собирали с планшета, количество клеток определяли с использованием NucleoCounter (зарегистрированная торговая марка) NC-200 (ChemoMetec), и клетки суспендировали в соответствующем количестве среды α -MEM, содержащей 15% ЭБС и дополнительно содержащей цитокин из Таблицы 4, добавляли в 6-луночный планшет G-Rex (зарегистрированная торговая марка) (WILSONWOLF) без иммобилизации и культивировали в условиях 5% CO₂/37°C. Клетки частями собирали с планшета 4-6 раз в дни 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14 и 17, и количество клеток определяли при помощи гемоцитометра.

Анти-CD3 антитело и RetroNectin иммобилизовали на культуральном планшете следующим способом. Анти-CD3 антитело (UCHT1, конечная концентрация 3000 нг/мл) и RetroNectin (конечная концентрация 150 мкг/мл), растворенные в PBS в необходимых концентрациях, добавляли в планшет и оставляли на ночь при 4°C. После промывания PBS планшет подвергали тестированию.

[0127]

Таблица 3

Название продукта	Производитель	Конечная концентрация
Добавки Инсулин-Трансферрин-Селен	Invitrogen	1x
2-фосфат аскорбиновой кислоты	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
Антитело против CD30 человека	R&D	300 нг/мл

[0128]

Таблица 4

Название продукта	Производитель	Конечная концентрация
Добавки Инсулин-Трансферрин-Селен	Invitrogen	1x
2-фосфат аскорбиновой кислоты	sigma	50 мкг/мл
IL-2	Peprotech	15 нг/мл
IL-7	Peprotech	10 нг/мл

IL-15	Peprotech	10 нг/мл
Антитело против CD30 человека	R&D	300 нг/мл

[0129]

Пролиферация $\gamma\delta$ T-клеток происходила при стимуляции анти-CD3 антителом (UCHT1) и анти-CD30 антителом (Фиг. 4).

[0130]

Пример 5. Получение $V\gamma 9V\delta 2$ -клеток, происходящих из иПС клеток

1. Получение иПС клеток

В качестве иПС клеток, аналогично Примеру 1, использовали линию клеток Ff-I01s04, предоставленную Центром исследования и применения иПС клеток (CiRA) Университета Киото. иПС культивировали в соответствии с протоколом «культивирование человеческих иПС клеток без питающих клеток», разработанным CiRA.

[0131]

2. Дифференциация иПС клеток в ГКП

Дифференциацию иПС клеток в гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП) проводили в соответствии с известным способом (WO 2017/221975), как описано в Примере 1.

[0132]

3. Ген $V\gamma 9V\delta 2$

Использовали полученный из клона G115 $\gamma\delta$ T-клеток T-клеточный рецептор $V\gamma 9V\delta 2$ ($V\gamma 9V\delta 2$ TCR G115). В качестве нуклеиновой кислоты, содержащей ген, кодирующий $V\gamma 9V\delta 2$ TCR G115, искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 7), спроектированный для расположения в порядке, указанном в Таблице 5, с N-конца.

[0133]

Таблица 5

Порядок с N-конца	Ген	Номер аминокислоты
1	TRG (из G115)	315
2	P2A	22
3	TRD (из G115)	292

[0134]

4. Получение ретровирусного вектора, несущего ген $V\gamma 9V\delta 2$

В качестве лентивирусного вектора использовали pLVSIN-Ub, в котором последовательность, кодирующая ген устойчивости к неомицину, была удалена из pLVSIN-CMV Neo (Clontech Laboratories, Inc.) и промотор CMV был заменен на промотор человеческого убиквитина. Искусственную олиго-ДНК, синтезированную в Примере 5.3, вставляли в сайт множественного клонирования ретровирусного вектора pLVSIN-Ub. Используя данную плазмиду, линию клеток Lenti-X™ 293T и систему упаковки Lenti-X™

Packaging Single Shots (VSV-G) от компании Clontech Laboratories, Inc., получали лентивирусный вектор.

[0135]

5. Получение V γ 9V δ 2Т-клеток, происходящих из иПС клеток

иПС клетки, полученные в Примере 5.1, и происходящие из иПС клеток гемопоэтические клетки-предшественники (ГКП), полученные в Примере 5.2, инфицировали ретровирусным вектором, полученным в Примере 5.4, несущим ген V γ 9V δ 2. Проводили дифференциацию этих клеток в Т-клетки известным способом (WO2017/221975) таким же образом, как в Примере 1, получая происходящие из иПС клеток V γ 9V δ 2Т-клетки. В качестве анти-CD3 антитела, используемого на этапе дифференциации, использовали 500 нг/мл UCNT1 (производства GeneTex). (Далее в настоящем документе происходящие из иПС клеток V γ 9V δ 2Т-клетки, полученные из иПС клеток, иногда называют «i γ 9 δ 2Т-клетки», и происходящие из иПС клеток V γ 9V δ 2Т-клетки, полученные из происходящих из иПС клеток ГКП, иногда называют «iН γ 9 δ 2Т-клетки»). Полученные i γ 9 δ 2Т-клетки и iН γ 9 δ 2Т-клетки анализировали на экспрессию CD3, γ δ TCR, V γ 9 и V δ 2 на поверхности клеточной мембраны при помощи проточного цитометра (BD FACSAria™ Fusion, производства BD Biosciences (Фиг. 5 и 6).

[0136]

Пример 6. Получение анти-CD19-CAR/IL-15 γ δ Т-клеток, происходящих из иПС клеток

1. Ген анти-CD19-CAR

В качестве нуклеиновой кислоты, содержащей ген анти-CD19-CAR, искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 2), спроектированный для расположения в порядке, указанном в Таблице 6, с N-конца.

[0137]

Таблица 6

Порядок с N-конца	Ген	Номер аминокислоты
1	лидерная последовательность тяжелой цепи иммуноглобулина	22
2	вариабельная область легкой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	104
3	линкер GGGGS	15
4	вариабельная область тяжелой цепи анти-CD19 антитела (FMC60)	120
5	полученная из CD8 последовательность (включая трансмембранную область)	83
6	область внутриклеточного домена CD28	41

7	область внутриклеточного домена 4-1BB	47
8	область внутриклеточного домена CD3 ζ	112

[0138]

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

Искусственную олиго-ДНК, синтезированную в Примере 6.1, вставляли в сайт множественного клонирования ретровирусного вектора рMY. Используя клетки FRY-RD18 для получения ретровирусного вектора, получали вирусный вектор.

[0139]

3. Ген IL-15R α /IL-15

В качестве нуклеиновой кислоты, содержащей гены IL-15R α /IL-15, искусственно синтезировали олиго-ДНК, кодирующую полипептид (SEQ ID NO: 6), спроектированный для расположения в порядке, указанном в Таблице 7, с N-конца.

[0140]

Таблица 7

Порядок с N-конца	Ген	Номер аминокислоты
1	лидерная последовательность человеческого IL-2	23
2	C-концевая последовательность человеческого IL-15	114
3	линкер GGGGS	24
4	C-концевая последовательность человеческого IL-15RA	239

[0141]

4. Получение ретровирусного вектора, несущего гены IL-15R α /IL-15

Искусственную олиго-ДНК, синтезированную в Примере 6.3, вставляли в сайт множественного клонирования ретровирусного вектора рMY. Используя клетки FRY-RD18 для получения ретровирусного вектора, получали вирусный вектор.

[0142]

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

i $\gamma\delta$ T-клетки, полученные в Примере 4, и iH $\gamma\delta$ 2T-клетки, полученные в Примере 5.5, инфицировали ретровирусным вектором, несущим ген анти-CD19-CAR, полученным в Примере 6.2, и ретровирусным вектором, несущим гены IL-15R α /IL-15, полученным в Примере 6.4, получая анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma\delta$ T-клетки, происходящие из иПС клеток. (Далее в настоящем документе происходящие из иПС клеток анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma\delta$ T-клетки, полученные из i $\gamma\delta$ T-клеток, иногда называют «iCD19CAR/IL-15 $\gamma\delta$ T-клетки», и происходящие из иПС клеток анти-CD19-CAR/IL-15 $\gamma\delta$ T-клетки, полученные из iH $\gamma\delta$ 2T-клеток, иногда называют «iHCD19CAR/IL-15 $\gamma\delta$ 2T-клетки»).

[0143]

Пример 7. Размножение культуры анти-CD19-CAR/IL-15 γ δ T-клеток, полученных из иПС клеток

1. Размножение культуры iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток

Способом, аналогичным способу, описанному в Примере 4, проводили размножение культуры iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток, полученных в Примере 6. Использовали среду, дополнительно содержащую цитокин из Таблицы 8, вместо дополнительно содержащегося цитокина из Таблицы 3, и дополнительно содержащую цитокин из Таблицы 9, вместо дополнительно содержащегося цитокина из Таблицы 4.

[0144]

Таблица 8

Название продукта	Производитель	Конечная концентрация
Добавки Инсулин-Трансферрин-Селен	Invitrogen	1x
2-фосфат аскорбиновой кислоты	sigma	50 мкг/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
Антитело против CD30 человека	R&D	300 нг/мл

[0145]

Таблица 9

Название продукта	Производитель	Конечная концентрация
Добавки Инсулин-Трансферрин-Селен	Invitrogen	1x
2-фосфат аскорбиновой кислоты	sigma	50 мкг/мл
IL-7	Peprotech	10 нг/мл
IL-15	Peprotech	10 нг/мл

[0146]

Пролиферация iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток происходила при стимуляции анти-CD3 антителом (UCHT1) и анти-CD30 антителом (Фиг. 7).

[0147]

2. Размножение культуры iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток

Способом, аналогичным способу, описанному в Примере 7.1, проводили

размножение культуры iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток, полученных в Примере 6. Антитело против CD30 человека (анти-CD30 человека антитело) не добавляли.

Пролиферация iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток происходила при стимуляции анти-CD3 антителом (UCHT1) (Фиг. 8).

[0148]

Пример 8. Изучение цитотоксической активности анти-CD19-CAR/IL-15 γ δ T-клеток, полученных из иПС клеток

Оценивали цитотоксическую активность iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток и iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток, полученных в Примере 7. Используя CD19-положительные клетки Raji и CD19-отрицательные клетки CCRF-CEN в качестве клеток-мишеней, смешивали iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клетки или iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клетки в 0,5, 1, 2, 4, 8, 16-кратной пропорции относительно клеток-мишеней. Цитотоксическую активность iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток и iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток оценивали на основании относительного количества погибших клеток-мишеней через 2 часа.

[0149]

В результате данной оценки было показано, что iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клетки и iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клетки обладают цитотоксической активностью в отношении CD19-положительных клеток Raji и не обладают цитотоксической активностью в отношении CD19-отрицательных клеток CCRF-CEN (Фиг. 9 и 10).

[0150]

Пример 9. Эффект iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток, приводящий к увеличению количества дней выживания

5×10^5 клеток Nalm6 (ATCC) трансплантировали мышам NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) (Central Institute for Experimental Animals, самки, возраст 7-8 недель) через хвостовую вену, получая мышей с ксенотрансплантатом клеток Nalm6. В день 4 после трансплантации суспензию iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток (5×10^6 (клеток)), полученных в Примере 6, в 0,1 мл HBSS-буфера или равное количество HBSS-буфера (контроль) вводили через хвостовую вену и определяли количество дней выживания животных.

Все мыши, которым трансплантировали CD19-положительные раковые клетки Nalm6 через хвостовую вену, погибли в пределах 3 недель в контрольной группе введения, в то время как все мыши выживали в течение по меньшей мере 6 недель в группе введения iCD19CAR/IL-15 γ δ T-клеток (Фиг. 11).

[0151]

Пример 10. *In vivo* противоопухолевый эффект iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток

Экспрессирующие люциферазу клетки Nalm6 (5×10^5 клеток, ATCC) трансплантировали мышам NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO (NOG) (Central Institute for Experimental Animals, самки, возраст 7-8 недель) через хвостовую вену, получая мышей с ксенотрансплантатом клеток Nalm6, экспрессирующих люциферазу. В день 4 после трансплантации суспензию iHCD19CAR/IL-15 γ δ 2T-клеток (5×10^6 (клеток)), полученных в Примере 6, в 0,1 мл HBSS-буфера или равное количество HBSS-буфера (контроль) вводили

через хвостовую вену. Через две недели после введения через хвостовую вену вводили люциферин, и активность люциферазы, экспрессируемой клетками Nalm6, определяли с использованием системы визуализации IVIS (IVIS LUMINA II, производства CaliperLS).

В контрольной группе введения люминесценцию от клеток Nalm6 наблюдали во всем теле, в то время как люминесценция была с трудом обнаружена в группе введения iHCD19CAR/IL-15 γ 9 δ 2T-клеток (Фиг. 12).

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

[0152]

В соответствии с настоящим изобретением могут быть эффективно получены γ δ T-клетки, и полученные таким образом клетки являются полезными для профилактики или лечения таких заболеваний, как опухоли и тому подобное.

[0153]

Настоящая заявка основана на патентной заявке № 2018-133727, поданной в Японии (дата подачи: 13 июля 2018 г.), и патентной заявке № 2019-117891, поданной в Японии (дата подачи: 25 июня 2019 г.), содержание которых включено в настоящий документ в полном объеме.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения $\gamma\delta$ T-клетки из индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки, где указанный способ включает следующие этапы:

(1) этап получения индуцированной плюрипотентной стволовой клетки из клетки, отличной от $\alpha\beta$ T-клетки,

(2-1) этап дифференциации индуцированной плюрипотентной стволовой клетки, полученной на этапе (1), в гемопоэтическую клетку-предшественник,

(2-2) этап дифференциации гемопоэтической клетки-предшественника, полученной на этапе (2-1), в CD3-положительную T-клетку, в присутствии ингибитора p38 и/или SDF-1 (фактора стромальных клеток 1),

(2-3) этап концентрирования CD3-положительной T-клетки, полученной на этапе (2-2), и

(2-4) этап размножения CD3-положительных T-клеток, содержащих $\gamma\delta$ T-клетки, полученные на этапе (2-3).

2. Способ по п.1, где указанная клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой мононуклеарную клетку, отличную от $\alpha\beta$ T-клетки.

3. Способ по п.1 или 2, где указанная клетка, отличная от $\alpha\beta$ T-клетки, представляет собой моноцит.

4. Способ по любому из пп.1-3, включающий этап введения

(i) нуклеиновой кислоты, кодирующей α TCR, и нуклеиновой кислоты, кодирующей β TCR,

(ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей γ TCR, и нуклеиновой кислоты, кодирующей δ TCR, и/или

(iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей CAR,

каждый из которых узнает и связывает опухоль-специфический антиген или опухоль-ассоциированный антиген, в клетку, полученную на любом из этапов (1), (2-1), (2-2) и (2-4).

5. Способ по п.4, где γ TCR представляет собой V γ 9TCR, и δ TCR представляет собой V δ 2TCR.

6. Способ по любому из пп.1-5, включающий стадию введения нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, включающий IL-15 и IL-15R α , в клетку, полученную на любом из этапов (1), (2-1), (2-2) и (2-4).

7. $\gamma\delta$ T-клетка, полученная способом по любому из пп.1-6.

8. Способ производства лекарственного средства, включающий следующие этапы (1) и (2):

(1) этап получения $\gamma\delta$ T-клетки способом по любому из пп. 1-6, и

(2) этап смешивания $\gamma\delta$ T-клетки, полученной на вышеупомянутом этапе (1), и фармакологически приемлемых эксципиентов.

9. Способ по п.8, где указанное лекарственное средство используют для предотвращения или лечения опухоли.

10. Способ производства средства уничтожения для опухолевой клетки, включающий следующие этапы (1) и (2):

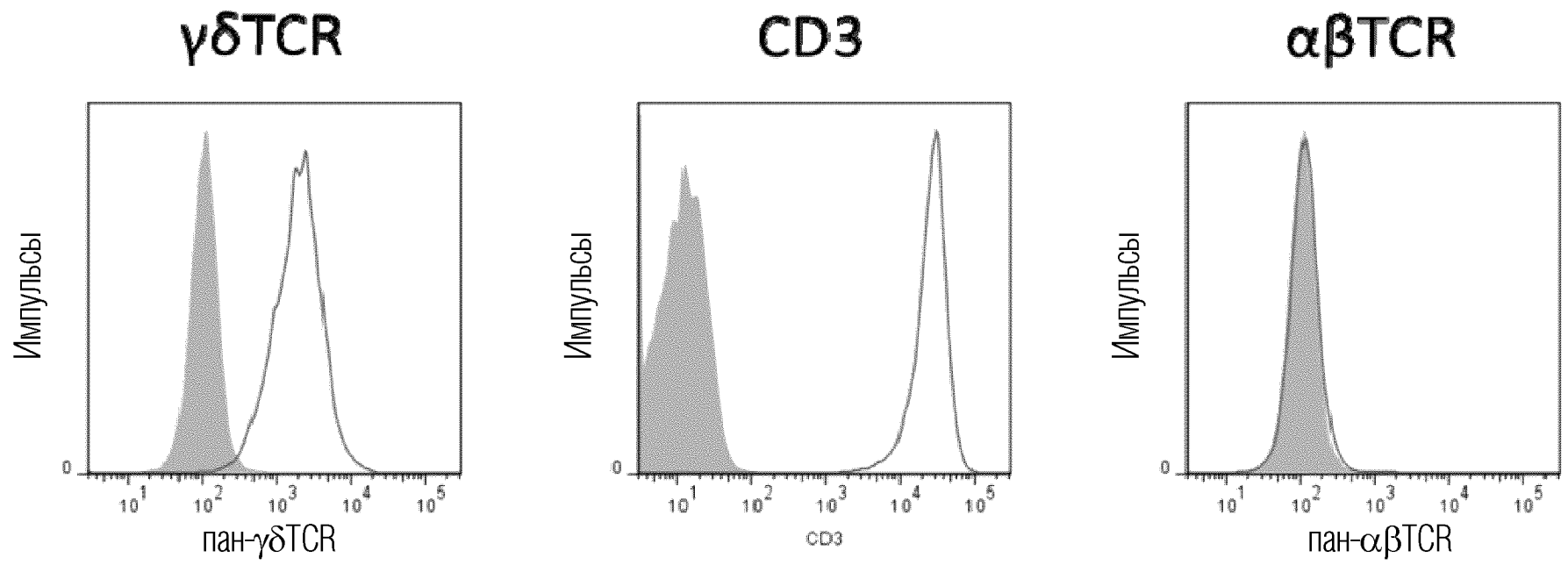
(1) этап получения $\gamma\delta$ T-клетки способом по любому из пп. 1-6, и

(2) этап смешивания $\gamma\delta$ T-клетки, полученной на вышеупомянутом этапе (1), и фармакологически приемлемых эксципиентов.

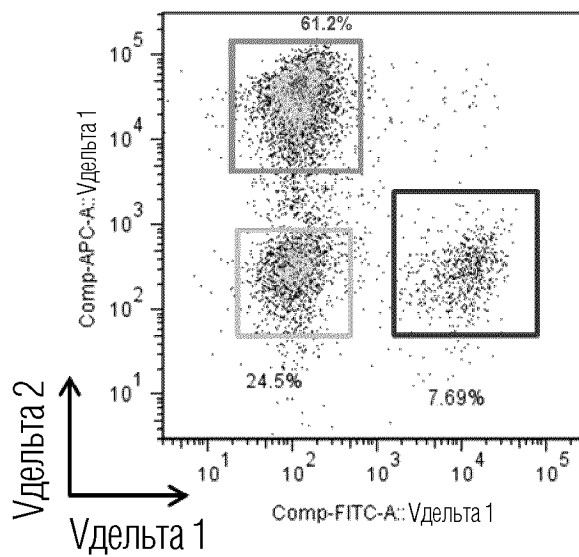
11. Способ предотвращения или лечения опухоли, включающий введение лекарственного средства, полученного способом по п.8.

По доверенности

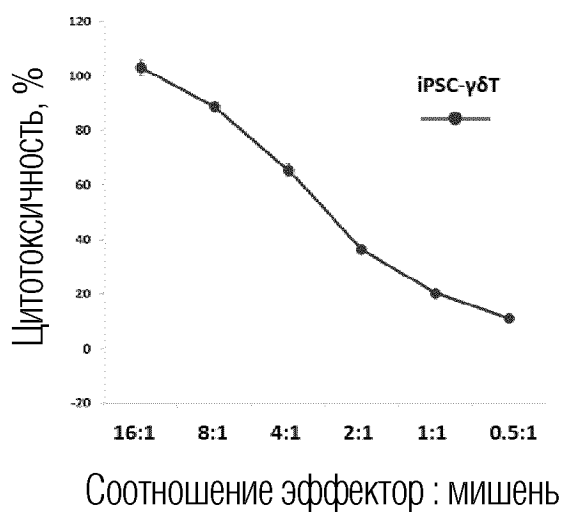
ФИГ. 1



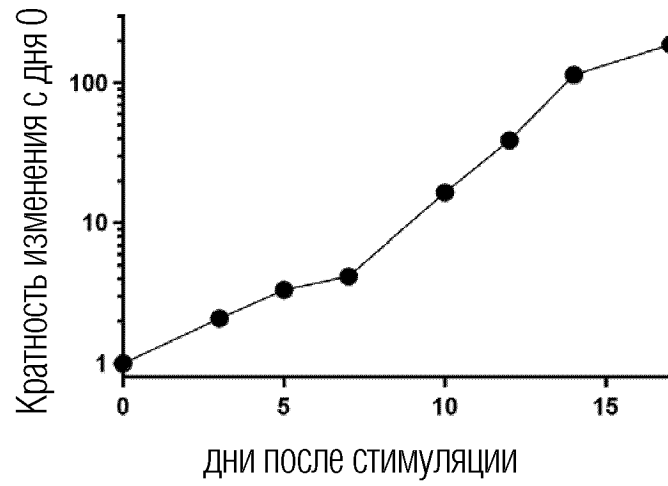
ФИГ. 2



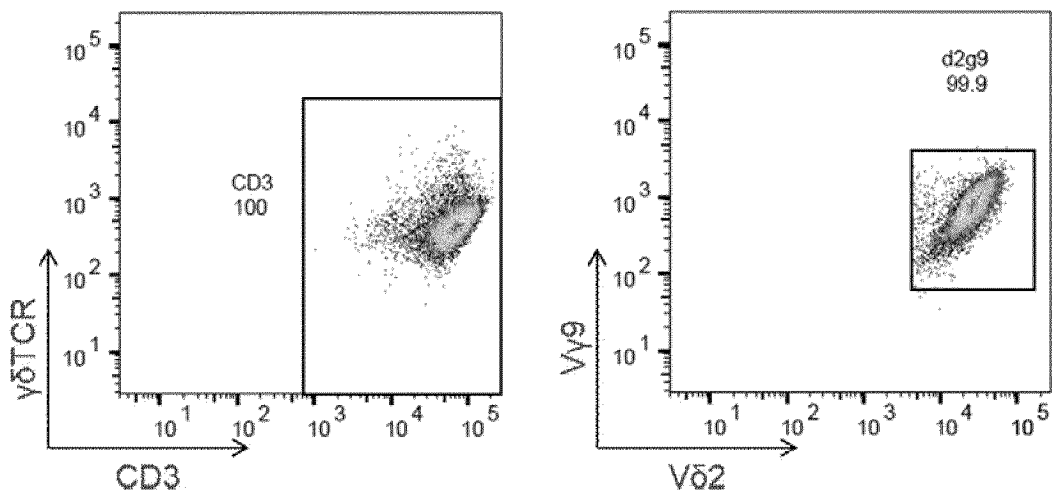
ФИГ. 3



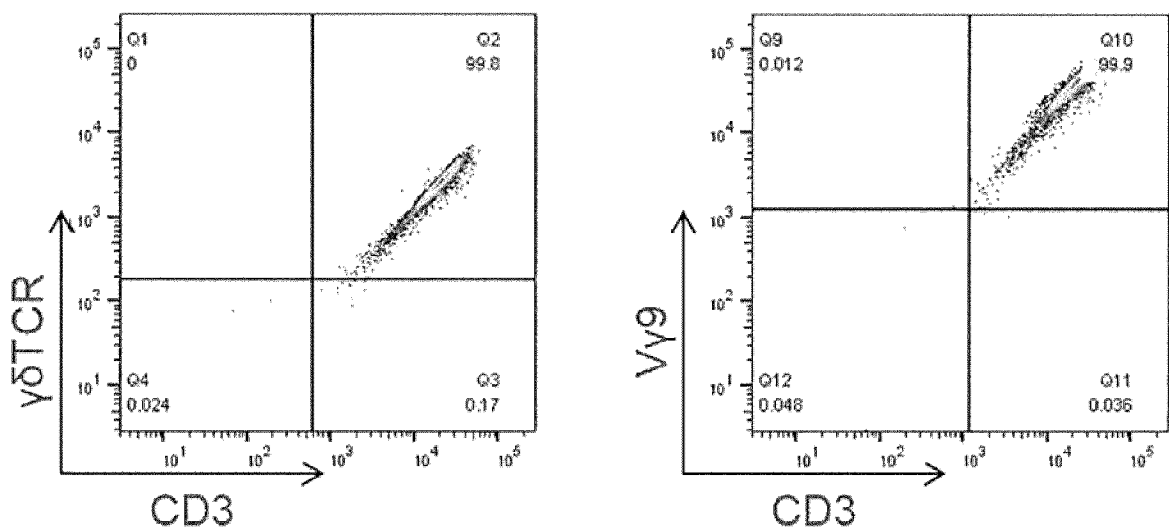
ФИГ. 4



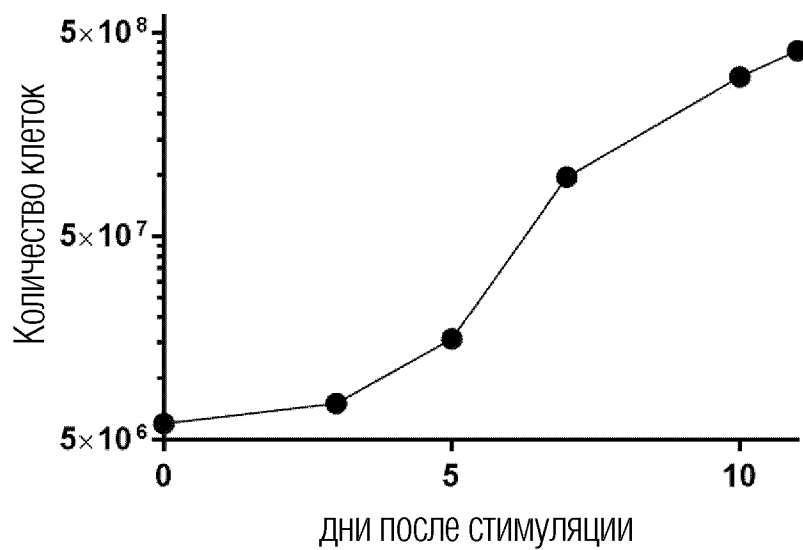
ФИГ. 5



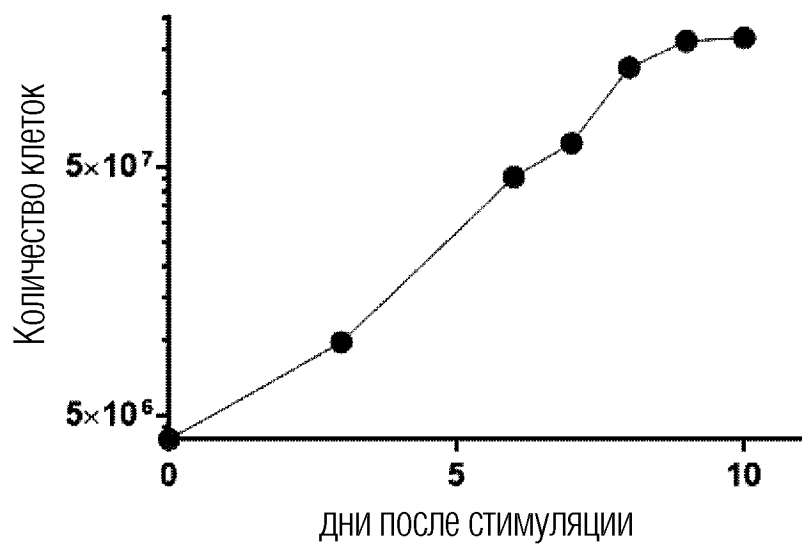
ФИГ. 6



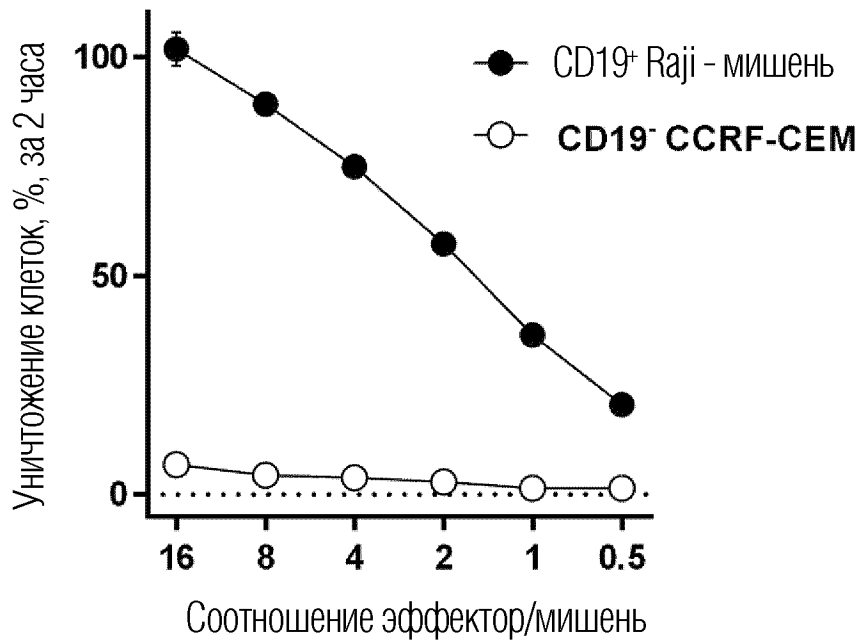
ФИГ. 7



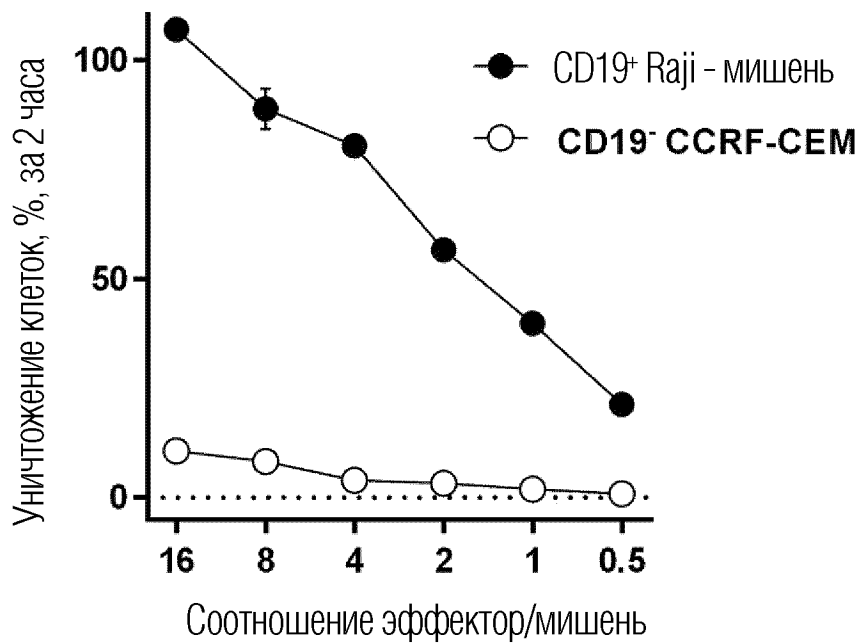
ФИГ. 8



ФИГ. 9



ФИГ. 10

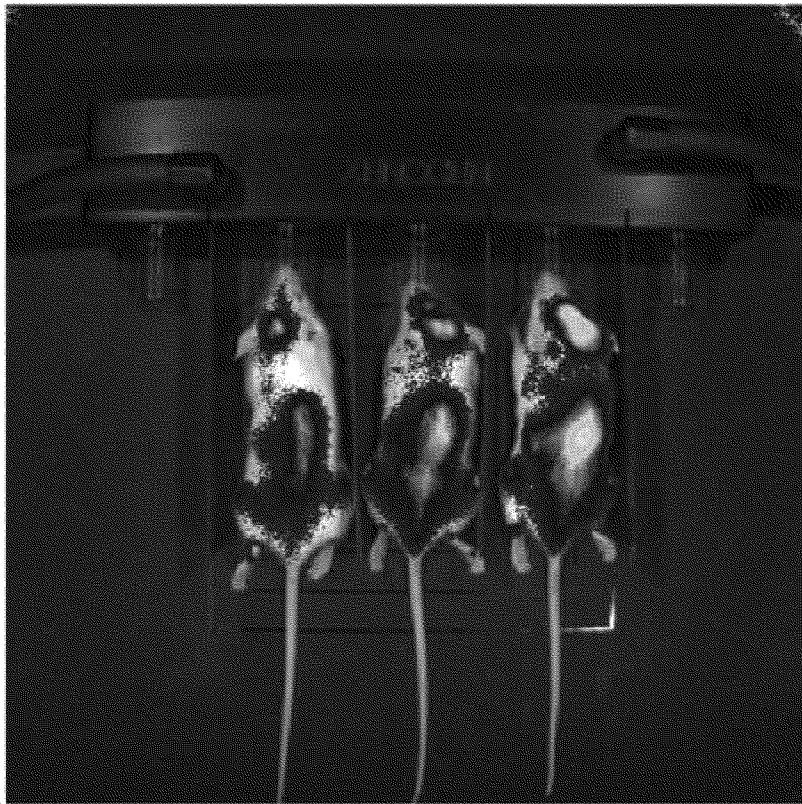


ФИГ. 11

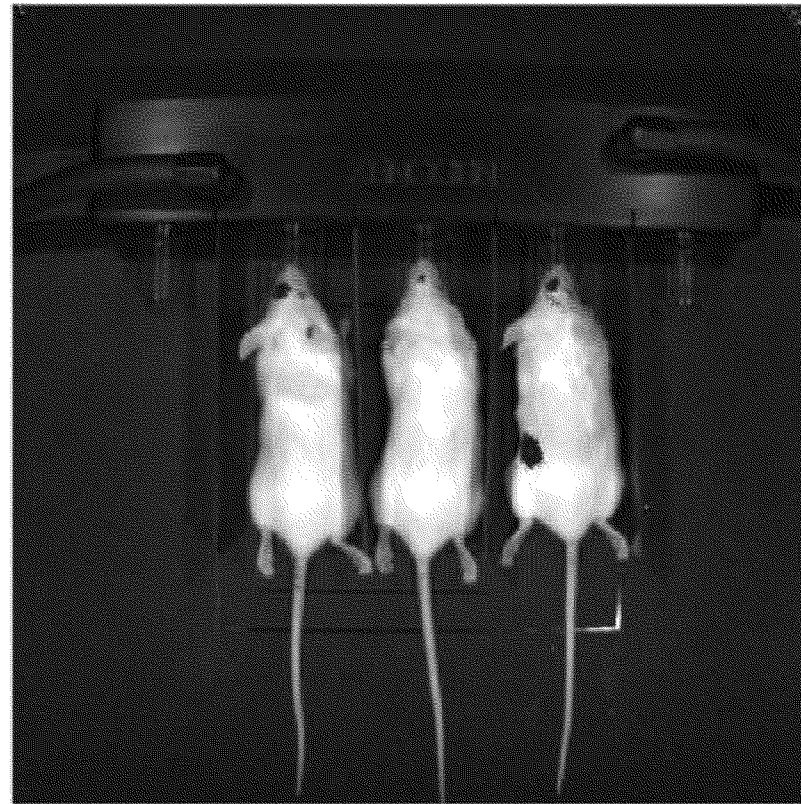


ФИГ. 12

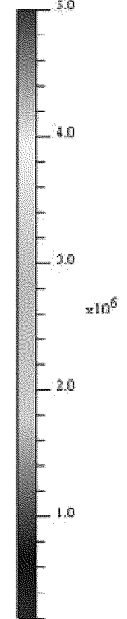
контроль



CD19-CAR-iy9δ2T



Люминесценция



7/7

Излучение
(ф/с/см²/ср)

Цвет Scale
Мин = 2,00e5
Макс = 5,00e6