

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-566787EA/061

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ РАКА

ИСПРАШИВАНИЕ ПРИОРИТЕТА

[0001] По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/698,254, поданной 15 июля 2018 года, которая полностью включена в настоящее описание посредством отсылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит Список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством отсылки во всей полноте. Указанная копия ASCII, созданная 3 июля 2019 года, названа 146616_00302_SL.txt и имеет размер 14051 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Терапия рака охватывает целый ряд терапевтических методов, включая хирургию, радиацию, химиотерапию, а также клеточную иммунотерапию. Хотя эти различные терапевтические методы обеспечивают широкий выбор способов лечения, существующие терапевтические средства обладают множеством недостатков, включая отсутствие селективности воздействия на клетки по сравнению со здоровыми клетками, токсическое действие и резистентность злокачественной опухоли к лечению. Более поздние методы, в которых используются направленные терапевтические средства, которые избирательно нарушают ключевые клеточные процессы раковых клеток по сравнению с нормальными клетками, привели к химиотерапевтическим схемам с меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с неспецифичной терапией, такой как лучевая терапия.

[0004] Иммунотерапия рака также стала многообещающим терапевтическим методом, дополняющим существующие стандарты лечения. См., например, Miller et al. *Cancer Cell*; 27:439-449 (2015). Эти методы включают использование антител для модуляции иммунной системы с целью уничтожения раковых клеток. Противоопухолевые иммунные ответы у некоторых пациентов с солидными опухолями усиливались при лечении антителом против PD1. Однако лишь небольшая часть пациентов поддается такому лечению, что подчеркивает необходимость в дополнительных методах и других методах лечения рака с целью усиления и дополнения существующих терапевтических стандартов лечения.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Изобретение относится к дендритным клеткам, включающим одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и/или CXCL13.

[0006] В некоторых вариантах осуществления одна или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот кодируют CD93.

[0007] Изобретение также относится к дендритной клетке, включающей

гетерологичный белок CD40L и гетерологичный белок CXCL13.

[0008] В некоторых вариантах осуществления клетка дополнительно включает гетерологичный белок CD93.

[0009] Кроме того, изобретение относится к активированным антигеном дендритным клеткам, где дендритная клетка включает одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и/или CXCL13. В некоторых вариантах осуществления одна или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот кодируют CD93.

[0010] В некоторых вариантах осуществления активированная антигеном дендритная клетка активирована при контакте с одним или более антигенами.

[0011] В некоторых вариантах осуществления антиген является опухолевым антигеном.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антиген является вирусным антигеном.

[0013] В некоторых вариантах осуществления антиген является лизатом клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления лизат клеток является аллогенным или аутологичным по отношению к активированной антигеном дендритной клетке.

[0015] В некоторых вариантах осуществления лизат клеток является лизатом, включающим один или комбинацию аллогенных лизатов клеток меланомы.

[0016] В некоторых вариантах осуществления аллогенный лизат клеток меланомы является лизатом клеток DDM-1.7, лизатом клеток DDM-1.13 или их комбинацией.

[0017] В некоторых вариантах осуществления лизат клеток является цельным лизатом клеток.

[0018] В некоторых вариантах осуществления лизат клеток является лизатом опухолевых клеток.

[0019] Кроме того, изобретение относится к композиции, включающей клетку, описанную в настоящем изобретении (рекомбинантную дендритную клетку или активированную клетку, или соответствующую композицию), где композиция не включает гетерологичный антиген.

[0020] Кроме того, изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей клетки по изобретению.

[0021] Кроме того, изобретение относится к способам лечения солидной опухоли, рака или злокачественного новообразования у субъекта, включающие введение субъекту любой из клеток или композиций по изобретению.

[0022] Кроме того, изобретение относится к способам лечения солидной опухоли, рака или злокачественного новообразования у субъекта, включающие введение субъекту любой из клеток или композиций по изобретению.

[0023] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает: скрининг профиля экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии субъекта с целью перекрестной проверки совпадения с профилем экспрессии

белков лизата аллогенной опухоли до введения; и

введение активированной лизатом аллогенной опухоли дендритной клетки или композиции активированных дендритных клеток, если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии перекрестно совпадают с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли.

[0024] В некоторых вариантах осуществления лизат аллогенной опухоли получен из аллогенной линии клеток меланомы, выбранной из группы, состоящей из DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинации.

[0025] В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка не имеет такой же тип HLA, как субъект.

[0026] В некоторых вариантах осуществления рак является солидной опухолью, выбранной из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы и других сарком, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, карциномы толстой кишки/рака толстой и прямой кишки, лимфоидного злокачественного образования, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, медуллярной карциномы щитовидной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, феохромоцитомы, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточной карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, опухоли яичка, семиномы, карциномы мочевого пузыря, меланомы и опухолей ЦНС (таких как глиома (например, глиома ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома краниофарингиома, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менингиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг).

[0027] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем внутриопухолевой, перитуморальной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной инъекции.

[0028] В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют путем подкожной, внутриопухолевой или внутрикожной инъекции.

[0029] В некоторых вариантах осуществления дендритную клетку или композицию замораживают или криоконсервируют и размораживают перед введением.

[0030] В некоторых вариантах осуществления дендритную клетку не активируют антигеном перед введением.

[0031] Кроме того, изобретение относится к набору, включающему любую из дендритных клеток или композиций по изобретению. В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки или композиции замораживают или криоконсервируют

в контейнере и необязательно включают замороженный или криоконсервированный лизат аллогенной опухоли в отдельном контейнере.

[0032] Кроме того, изобретение относится к набору, включающему любую из дендритных клеток или композиций, описанных в настоящем изобретении, где дендритная клетка или композиция заморожены или криоконсервированы в контейнере и необязательно включают замороженный или криоконсервированный лизат аутологичной опухоли в отдельном контейнере.

[0033] Кроме того, изобретение относится к набору, включающему любую из дендритных клеток или композиций, описанных в настоящем изобретении, где активированная дендритная клетка или композиция заморожена или криоконсервирована в контейнере.

[0034] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает отдельные контейнеры, включающие один или более буферов, и необязательно включает одно или более активирующих средств.

[0035] В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает инструкции по инкубированию и/или обработке дендритных клеток или композиций.

[0036] Кроме того, изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему:

скрининг профиля экспрессии белков образцов резецированной опухоли или биопсии субъекта для перекрестной проверки совпадения с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли до введения;

если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков образцов резецированной опухоли или биопсии соответствуют профилю экспрессии белков лизата аллогенной опухоли, введение субъекту какую-либо из дендритных клеток или композиций по изобретению; или

если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков образцов резецированной опухоли или биопсии не соответствуют профилю экспрессии белков лизата аллогенной опухоли, то

(a) введение субъекту композиции, включающей лизат аутологичной опухоли, активированный любой из дендритных клеток или композиций, описанных в настоящем изобретении или

(b) введение субъекту любой из клеток или композиций, описанных в настоящем изобретении, которые не были активированы антигеном.

[0037] Кроме того, изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту любой из дендритных клеток или композиций, как предусмотрено в настоящем изобретении, где дендритная клетка или композиция не активированы опухолевым антигеном.

[0038] Кроме того, изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту любой из дендритных клеток или композиций по изобретению, где дендритная клетка активирована опухолевым антигеном или лизатом.

[0039] Кроме того, изобретение относится к способу активации иммунной системы, включающему введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любой из дендритных клеток или композиций, описанных в настоящем изобретении.

[0040] Кроме того, изобретение относится к способу получения незрелых дендритных клеток, включающему:

культивирование CD14⁺ и/или CD1a⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, с получением незрелых дендритных клеток *in vitro*.

[0041] В некоторых вариантах осуществления способ включает контакт незрелой дендритной клетки с композицией, включающей одно или более из: ФНО- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ и pIC.

[0042] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

[0043] В некоторых вариантах осуществления получение включает контакт CD14⁺ моноцитов с одним или более векторами, кодирующими CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

[0044] В некоторых вариантах осуществления вектор является рекомбинантным аденовирусным вектором, рекомбинантным ретровирусным вектором или рекомбинантным лентивирусным вектором, или их комбинацией.

[0045] В некоторых вариантах осуществления получение CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, включает контакт моноцитов с одной или более конструкциями CRISPR с получением CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

[0046] В некоторых вариантах осуществления конструкцией CRISPR является CAS9.

[0047] В некоторых вариантах осуществления контакт включает трансфекцию, трансдукцию, электропорацию, инфицирование или их любую комбинацию.

[0048] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает замораживание незрелых дендритных клеток.

[0049] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает контакт незрелых дендритных клеток с лизатом аутологичной опухоли или лизатом аллогенной опухоли перед созреванием.

[0050] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает замораживание дендритных клеток после созревания.

[0051] В некоторых вариантах осуществления CD14⁺ моноциты дополнительно модифицированы для гетерологичной экспрессии CD93.

[0052] В некоторых вариантах осуществления лизат аллогенной опухоли получен из аллогенной линии клеток меланомы, выбранной из группы, состоящей из DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинации.

[0053] В некоторых вариантах осуществления лизат является лизатом цельных клеток.

[0054] В некоторых вариантах осуществления у пациента усиливается реакция трансплантата против опухоли (GVT).

[0055] В некоторых вариантах осуществления, в период времени от 4 до 14 дней после введения дендритных клеток или композиций, пациенту дополнительно вводят ингибитор иммунной контрольной точки, включающий любой один или комбинацию двух ингибиторов контрольных точек, включая ингибитор PD-1 или PD-L1 (B7-H1), такой как антитело к PD-1, включая ниволумаб (Ниволумаб, Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб/ламбролизумаб, также известный как МК-3475 (Китруда, Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune) или антитело к PD-L1, включая MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718 C (Merck), антагонист CTLA-4, такой как антитело к CTLA-4, включая антитело к CTLA4 Ервой™ (ипилимумаб, Bristol-Myers Squibb), тремелимумаб (Pfizer), тицилимумаб (AstraZeneca) или AMGP-224 (Glaxo Smith Kline), или опухолеспецифичное антитело трастузумаб (Герцептин) для лечения рака молочной железы, ритуксимаб (Ритуксан) для лечения лимфомы или цетуксимаб (Эрбитукс).

[0056] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных средств, обычно применяемых для лечения рака.

[0057] В некоторых вариантах осуществления дополнительное средство выбрано из радиации, химиотерапии, конъюгата антитела-лекарственного средства и иммуномодулирующего антитела.

[0058] В некоторых вариантах осуществления химиотерапия включает цисплатин, карбоплатин, паклитаксел, доцетаксел, гемцитабин, винорелбин, винбластин, иринотекан, этопозид или пеметрексед, или их комбинации или фармацевтически приемлемую соль.

[0059] В некоторых вариантах осуществления иммуномодулирующее антитело является антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом к CD40, антителом к CTLA-4 или антителом к OX40, или их любой комбинацией.

[0060] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела-лекарственного средства направленно воздействует на с-Met киназу, LRRRC15, EGFR или CS1 или их любую комбинацию.

[0061] В некоторых вариантах осуществления лечение или усиление иммунного ответа повторяют периодически в течение периодов времени от одного раза в 5 дней, одного раза в неделю, одного раза в 10 дней, одного раза в 14 дней, одного раза в 21 день, одного раза в месяц до одного раза в два месяца, до одного раза в 3 месяца, до одного раза в 4 месяца, до одного раза в 5 месяцев, до одного раза в 6 месяцев, или один раз в 7 месяцев, или один раз в 8 месяцев, или один раз в 9 месяцев, или один раз в 10 месяцев или один раз в 11 месяцев, или один раз в год, в качестве поддерживающего лечения до тех пор, пока у пациента наблюдается улучшение или стабильное/непрогрессирующее

заболевание.

[0062] В настоящем изобретении раскрыты способы и композиции для лечения рака путем индукции иммунного ответа путем введения дендритных клеток, экспрессирующих гетерологичные белки. В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка включает одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка дополнительно включает гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD93. В дополнительных вариантах осуществления дендритная клетка включает одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и CD93. В дополнительных вариантах осуществления дендритная клетка включает одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CXCL13 и CD93.

[0063] В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка с суперэкспрессией CD40L и CXCL13 и, необязательно, CD93 может быть дендритной клеткой, активированной антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген может быть опухолевым антигеном или вирусным антигеном. В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки являются аллогенными или аутологичными по отношению к субъекту.

[0064] В других вариантах осуществления способ лечения рака у субъекта включает введение субъекту композиции, включающей дендритную клетку, где дендритная клетка повышено экспрессирует один или более белков, выбранных из CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает:

(a) получение профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии субъекта;

(b) сравнение профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии с профилем экспрессии белков лизата клетки меланомы; и

(c) если по меньшей мере три маркера в профиле экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии совпадают с профилем экспрессии белков лизата клеток меланомы, то совместное культивирование дендритной клетки с лизатом клеток меланомы для активации дендритной клетки и введение субъекту композиции, включающей активированную дендритную клетку;

или

(d) если по меньшей мере три маркера в профиле экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии не совпадают с профилем экспрессии белков лизата клеток меланомы, то совместное культивирование дендритной клетки с лизатом аутологичной опухоли или биопсии для активации дендритной клетки и введение субъекту композиции, включающей аутологично активированную дендритную клетку.

[0065] В дополнительном варианте осуществления способ получения незрелых дендритных клеток включает:

- (a) выделение CD14+ моноцитов у субъекта;
- (b) суперэкспрессию CD40L, CXCL13 и CD93 в выделенных CD14+ моноцитах; и
- (c) дифференцировку CD14+ моноцитов с получением незрелых дендритных клеток *in vitro*.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0066] **Фигуры 1A-D** являются диаграммами и схематическими изображениями, на которых показаны различные процессы экспрессии и активации в некоторых иммунных клетках. **Фиг. 1A** является диаграммой, на которой показан механизм действия экспрессии CD40L. **Фиг. 1B** является диаграммой, на которой показан процесс иммунного рекрутинга экспрессия CXCL13. **Фиг. 1C** является схематическим изображением, на котором показан цикл противоопухолевого иммунитета. **Фиг. 1D** является схематическим изображением, на котором показаны различные стадии созревания дендритной клетки.

[0067] **Фигуры 2A-F** являются проточно-цитометрическими изображениями ClinMACS выделенных CD14+ моноцитов для фенотипирования и оценки чистоты.

[0068] **Фигуры 3A-P** являются проточно-цитометрическими изображениями, на которых показано фенотипирование образца незрелых аллогенных дендритных клеток (аллоДК). Иллюстрирующие, что образец был исследован на следующие маркеры: линия негативной дифференцировки: (CD3-, CD56-, CD19-, CD66b-), CD45+, CD14-, CD40L+, CXCL13+, CD1c+, CD11b+, CD11c+, HLA-DR+, CD86+, CD80low, CD83-, CD16Low, CD33+, CD163-, CD206+, CD209, CD40L.

[0069] **Фигуры 4A-B** являются проточно-цитометрическими изображениями, на которых показано, что незрелые рекомбинантные аллоДК демонстрируют фагоцитарную способность.

[0070] **Фигуры 5A-D** являются изображениями флуоресцентных индикаторов стимулированной аллоДК пролиферации аллогенных Т-клеток, показанной с помощью окрашивания при разведении сукцинимидиловым сложным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE).

[0071] **Фигуры 6A-B** являются изображениями колоректальной опухоли пациента до лечения (**Фиг. 6A**) и через шесть месяцев после лечения (**Фиг. 6B**) вакциной на основе нагруженных аутологичной опухолью аллоДК CD40L+.

[0072] **Фигуры 7A-D** являются изображениями множественных метастазов в печени пациента из колоректальной опухоли до лечения (**Фиг. 7A, Фиг. 7C**) и через шесть месяцев после лечения (**Фиг. 7B** и **Фиг. 7D**) вакциной на основе нагруженных аутологичной опухолью аллоДК CD40L+.

[0073] **Фигуры 8A-D** являются изображениями метастазирующих инвазивных протоковых опухолей молочной железы пациента до лечения (**Фиг. 8A, Фиг. 8C**) и через шесть месяцев после лечения (**Фиг. 8B** и **Фиг. 8D**) вакциной на основе нагруженных аутологичной опухолью аллоДК CD40L+CXCL13+.

[0074] **Фигура 9** является схематическим изображением, на котором показан примерный обзор по введению рекомбинантной аллоДК вакцины, описанной в настоящем

изобретении.

[0075] **Фигура 10** является графиком, на котором показана пролиферация Т-клеток в сокультуре с рекомбинантными ДК, экспрессирующими CD40L, CD40L+ CXCL13, или с тройной экспрессией CD40L+CXCL13+CD93, при этом тройная экспрессия продемонстрировала максимальный уровень пролиферации Т-клеток.

[0076] **Фигура 11** является графиком, на котором показана пролиферация NK-клеток в сокультуре с рекомбинантными ДК, экспрессирующими CD40L, CD40L+ CXCL13, или с тройной экспрессией CD40L+CXCL13+CD93, при этом тройная экспрессия продемонстрировала максимальный уровень пролиферации NK-клеток.

[0077] **Фигура 12** является изображениями сортировки клеток для определения активации В-клеток при определении с помощью проточной цитометрии уровней экспрессии CD69 в CD19+ клетках в день 4.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0078] Настоящие варианты осуществления частично направлены на способы и композиции, относящиеся к дендритным клеткам, трансдуцированным CD40L, CXCL13 и/или CD93. CD40L, CXCL13 и/или CD93 могут быть человеческими. В некоторых вариантах осуществления CD40L, CXCL13 и/или CD93 принадлежат грызуну (мыши или крысе) или свинье. Клетки, включающие гетерологично экспрессируемые белки, могут называться рекомбинантными клетками. Композиции могут быть отдельной композицией рекомбинантных ДК (дендритных клеток), или, в альтернативных вариантах осуществления, рекомбинантные ДК клетки могут быть активированы антигеном при контакте с клетками, что также может называться "нагрузкой", с опухолевым лизатом или, в альтернативе, нагружены аллогенным ("доступным в продаже") опухолевым лизатом в качестве вакцинации и/или иммунного адьюванта для субъектов с солидными опухолями и злокачественными новообразованиями. В некоторых вариантах осуществления опухолевый лизат является аллогенным по отношению к источнику дендритных клеток. В некоторых вариантах осуществления опухолевый лизат является аутологичным по отношению к источнику дендритных клеток.

[0079] Дендритные клетки (ДК) являются специализированными антигенпроцессирующими клетками. Они имеют множество рецепторов, которые способствуют захвату антигенов, при этом они способны превращать эти антигены в МНС-пептидные комплексы, которые могут распознаваться лимфоцитами.

[0080] Без ограничения теорией, настоящие композиции и способы основаны, по меньшей мере частично, на способности рекомбинантных (или трансгенных) дендритных клеток вызывать смешанную лейкоцитарную реакцию (СЛР) на участке инъекции. При тестировании в хорошо известном клиническом анализе СЛР рекомбинантные аллоДК, описанные в настоящем изобретении, являлись основными стимуляторами и были необычайно эффективными. В некоторых вариантах осуществления ДК могут быть аллогенными для субъекта. В таких вариантах осуществления ДК могут называться аллоДК. аллоДК представляют собой клетки, которые являются аллогенными по

отношению к субъекту, которому их вводят.

[0081] В некоторых вариантах осуществления ДК трансдуцируют CD40L и/или CXCL13 для максимального привлечения Т-клеток и В-клеток пациентов и генерации каскада противоопухолевого клеточного и гуморального иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления ДК трансдуцируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК трансдуцируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК трансдуцируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК трансдуцируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления клетки не трансдуцируют CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0082] В других необязательных вариантах осуществления трансдукция CD40L+ и CXCL13+ аллоДК CD93 способствует перекрестной коммуникации между аллогенными ДК и ДК реципиента, создавая стабильную и длительную противоопухолевую иммуногенность у реципиента.

[0083] В некоторых вариантах осуществления человеческие CD14+ моноциты трансфицируют рекомбинантным вектором, кодирующим CD40L и CXCL13 (и, необязательно, CD93) или их любую комбинацию, как описано в настоящем изобретении, для их стабильной экспрессии на моноцитах человека. Могут быть отобраны положительно трансдуцированные моноциты, а затем моноциты могут дифференцировать в незрелые и/или зрелые ДК *in vitro*. В случае резецированных и подвергнутых биопсии пациентов со злокачественными опухолями может быть получен аутологичный опухолевый лизат, и опухолевый лизат может быть презентирован незрелым рекомбинантным аллоДК (рекомбинантным из аллоДК) для процессирования аутологичного опухолевого лизата рекомбинантными из аллоДК. В некоторых вариантах осуществления производят скрининг профиля экспрессии белков в образцах резецированной опухоли и образцах биопсии. Если профили экспрессии показывают присутствие по меньшей мере 3 совпадающих фрагментов с GMP-MCV, то тогда рекомбинантные изДК нагружают GMP-MCV до созревания ДК *in vitro*. В случае любого неоперабельного и не подлежащего биопсии пациента рекомбинантные CD40L+ CXCL13+ аллоДК (или, необязательно, дополнительно включающие CD93+) могут вводить пациенту без нагрузки антигеном в качестве иммунного адьюванта. С применением такого подхода CD40L+ CXCL13+ (необязательно) CD93 аллоДК, у пациентов с поздними стадиями рака может быть инициирован новый противоопухолевый клеточный и гуморальный иммунный ответ против опухолевых антигенов, и, без ограничения каким-либо конкретным механизмом, иммунный ответ может быть усилен.

[0084] Другой опухолевый лизат, который можно использовать для активации рекомбинантных ДК, включает DDM-1.7 и/или DDM-1.13. Описание DDM-1.7 и DDM-1.13 можно найти в патентах США 7,771,998 и 7,723,107 (включая общедоступные сведения о депонировании: ECACC 01112339 и ECACC 01112338, соответственно), каждый из которых настоящим включен посредством отсылок во всей своей полноте.

[0085] В рамках изобретения дендритные клетки, которые являются незрелыми, являются клетками, обладающими следующими маркерными характеристиками: CD1a-положительные, CD14-отрицательные и CD83-отрицательные/низкие.

[0086] В некоторых вариантах осуществления источником дендритных клеток может быть донорская периферическая кровь, которая включает дендритные клетки, полученные из CD14⁺ моноцитов или CD34⁺ клеток. В некоторых вариантах осуществления донор не является субъектом, подвергаемым лечению дендритными клетками и композициями, описанными в настоящем изобретении.

[0087] В последние годы стало понятно, что эффективный способ доставки антигена к Т-клеткам, особенно к наивным Т-клеткам, осуществляется с помощью дендритных клеток. Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антигенпрезентирующими клетками, и иммунотерапию на основе ДК уже использовали в различных условиях для лечения рака (Kugler et al., 2000, Nat. Med., v. 6, pp. 332-336; Nestle et al., 1998, Nature (Med.), v. 4, pp. 328-332; Thurner et al., 1999, J. Exp. Med., v. 190, pp. 1669-1678), продемонстрировав высокую эффективность данного способа иммунизации.

[0088] Одним из уникальных свойств ДК является их способность захватывать посредством эндоцитоза экзогенные белки, которые затем процессируются и презентуются в виде пептидных эпитопов на их поверхности в сочетании с антигенами МНС класса I. Антигенпрезентирующие дендритные клетки могут распознаваться цитотоксическими Т-клетками. Это свойство важно, когда антигены опухолевых клеток применяют в форме опухолевых лизатов или апоптотических телец, добавленных экзогенно. Считается, что высокая эндоцитарная активность связана с незрелым состоянием дифференцировки ДК на основе сравнения незрелых и зрелых ДК (Sallusto et al., 1995, J. Exp. Med., v. 182, pp. 389-400).

[0089] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные дендритные клетки обрабатывают интерфероном альфа (IFN- α) и/или 5'-аза-2'-дезоксцитидином (Aza) до или во время нагрузки рекомбинантных дендритных клеток лизатом опухолевых клеток и/или антигеном. См. <https://doi.org/10.1101/531616>.

[0090] В некоторых вариантах осуществления очищенные человеческие CD14⁺ моноциты трансдуцируют рекомбинантным вектором, таким как аденовирусный или лентивирусный вектор, включающий конструкции CD40L и CXCL13 человека, и, необязательно, также CD93, что позволяет рекомбинантным молекулам экспрессироваться на очищенных человеческих моноцитах. Положительно трансдуцированные моноциты затем отбирают и затем их подвергают дифференцировке в незрелые ДК (нзДК) *in vitro*, при этом они называются рекомбинантными аллогенными ДК (рекомбинантными аллоДК). В некоторых вариантах осуществления экспрессия является стабильной экспрессией. В некоторых вариантах осуществления экспрессия является суперэкспрессией. "Суперэкспрессия" относится к уровню, который по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400% или

500% превышает нативные уровни экспрессии. Нативные уровни экспрессии относятся к уровням экспрессии клеток, которые не были трансдуцированы вектором для экспрессии гетерологичного белка или белков, представляющих интерес, таких как CD40L, CXCL13 и/или CD93.

[0091] Описание различных стадий дендритных клеток и факторов созревания/активации показано на Фиг. 1D (см. публикацию Front Immunol. 2013; 4:438, которая настоящим полностью включена посредством отсылки).

[0092] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ДК подвергают созреванию при контакте с факторами созревания после нагрузки лизатом опухолевых клеток и/или антигеном. Такие факторы созревания включают, по меньшей мере: IL-1 β , IL-6, ФНО- α и PGE2 или их любую комбинацию. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные ДК подвергают созреванию при контакте с факторами созревания до контакта с лизатом опухолевых клеток и/или антигеном. В некоторых вариантах осуществления ДК подвергают созреванию при использовании факторов созревания и не подвергают контакту с лизатом опухолевых клеток и/или антигеном. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные дендритные клетки культивируют или инкубируют с цитокином, выбранным из группы, состоящей из IL-4, GM-CSF, IL-13, IFN- γ , Flt-3L, SCF и ФНО- α .

Сокращения

WBC: лейкоцит

ИПС: 70% изопропиловый спирт

QA: гарантия качества

QC: контроль качества

Об.: объем

КТ: комнатная температура

ДК: дендритные клетки

нзДК: Незрелые дендритные клетки

зДК: Зрелые дендритные клетки

АллоДК: аллогенные дендритные клетки

MCV: MalCancerVac

GM-CSF: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

IL-4: интерлейкин 4

IL-1 β : интерлейкин 1 β

IL-15: интерлейкин 15

ФНО α : фактор некроза опухоли α

pIC: Полиинозиновая:полицитидиловая кислота

IFN- α : интерферон α

IFN- γ : интерферон γ

CXCL13: лиганд 13 хемокина с мотивом C-X-C

CD40L: лиганд CD40

MAGE: меланома-ассоциированный антиген

MOI: множественность заражения

[0093] При использовании в настоящей заявке и в формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста прямо не следует иное. Кроме того, термин "включает" означает "содержит".

[0094] Термины "пациент" и "субъект" являются взаимозаменяемыми и могут означать любой живой организм, который можно лечить соединениями настоящего изобретения. По существу, термины "пациент" и "субъект" могут включать, без ограничения, любое не относящееся к человеку млекопитающее, примата или человека. В некоторых вариантах осуществления "пациент" или "субъект" является млекопитающим, таким как мыши, крысы, другие грызуны, кролики, собаки, кошки, свиньи, рогатый скот, овцы, лошади, приматы или человек. В некоторых вариантах осуществления пациентом или субъектом является взрослый, ребенок или грудной ребенок. В некоторых вариантах осуществления пациентом или субъектом является человек.

[0095] Термин "приблизительно", если он непосредственно предшествует числовому значению, означает диапазон плюс или минус 10% от данного значения, например, "приблизительно 50" означает 45-55, "приблизительно 25000" означает 22500-27500 и т.д., если из контекста описания не следует иное или не противоречит такой интерпретации. Например, при перечислении числовых значений, таком как "приблизительно 49, приблизительно 50, приблизительно 55", "приблизительно 50" означает диапазон, распространяющийся на меньше чем половину интервала(ов) между предыдущим и последующим значениями, например, от больше чем 49,5 до меньше чем 52,5. Кроме того, фразы "меньше чем приблизительно" значение или "больше чем приблизительно" значение следует понимать с учетом определения термина "приблизительно", представленного в настоящем изобретении. Кроме того, если диапазон написан как "приблизительно X-Y", "приблизительно" относится как к значению X, так и Y, если из контекста не следует иное.

[0096] Термины "вводить" или "введение" в рамках изобретения относятся либо к прямому введению соединения, клетки, композиции, либо к фармацевтической композиции, которая также может именоваться средством, представляющим интерес. В некоторых вариантах осуществления композиции были простерилизованы или отфильтрованы с целью удаления любых вирусных или бактериальных частиц.

[0097] Подразумевается, что термины "совместное введение" и т.п. охватывают введение отобранных терапевтических средств одному пациенту и должны включать схемы лечения, в которых средства вводят одним и тем же путем или разными путями введения, или в одно и то же или разное время.

[0098] "Терапевтически эффективное количество" композиции является количеством, достаточным для достижения требуемого эффекта, т.е. облегчения, предупреждения или уменьшения интенсивности нежелательного состояния, заболевания или симптома пациента. Активность, предусмотренная настоящими способами, может

включать как терапевтическое, так и профилактическое лечение, в зависимости от ситуации. Определенная доза может определяться конкретными обстоятельствами в конкретном случае, включая, например, вводимое терапевтическое средство, путь введения и состояние, подвергаемое лечению. Вводимое эффективное количество может определять врач с учетом соответствующих обстоятельств, включая состояние, подвергаемое лечению, выбор вводимого терапевтического средства и выбранный путь введения.

[0099] Термин "ингибирование" включает введение терапевтического средства согласно вариантам осуществления в настоящем изобретении для предотвращения начала симптомов, облегчения симптомов или устранения заболевания, состояния или нарушения.

[0100] Под "фармацевтически приемлемым" подразумевается, что носитель, разбавитель или вспомогательное вещество должны быть совместимыми с другими компонентами терапевтического средства и не оказывать вредного воздействия на реципиента.

[0101] Термины "лечить", "подвергнутый лечению" или "лечение" в рамках изобретения относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, целью которых является подавление, предотвращение или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического состояния, нарушения или заболевания, или для улучшения, подавления или получения иных полезных или требуемых клинических результатов. Положительные или требуемые клинические результаты включают, без ограничения перечисленным, улучшение или облегчение симптомов; уменьшение степени состояния, нарушения или заболевания; стабилизацию (то есть отсутствие ухудшения) статуса состояния, нарушения или заболевания; задержку начала или замедление прогрессирования состояния, нарушения или заболевания; уменьшение интенсивности состояния, нарушения или заболевания; и ремиссию (частичную или полную), обнаруживаемую или необнаруживаемую, или улучшение состояния, нарушения или заболевания. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерного уровня побочных эффектов. Лечение также включает увеличение выживаемости по сравнению с ожидаемой выживаемостью при отсутствии лечения.

[0102] Переходный термин "включающий", который является синонимом терминов "содержащий" или "отличающийся тем, что", является включающим или открытым и не исключает дополнительных, неперечисленных элементов или этапов способов. В отличие от этого переходная фраза "состоящий из" исключает любой элемент, этап или ингредиент, не указанный в пункте формулы изобретения. Переходная фраза "состоящий по существу из" ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными материалами или этапами, "и теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики" заявленного изобретения. В вариантах осуществления или формуле изобретения, где термин "включающий" используется в качестве переходной

фразы, такие варианты осуществления также могут предусматриваться с заменой термина "включающий" терминами "состоящий из" или "состоящий по существу из".

[0103] В настоящем изобретении раскрыты способы и композиции для лечения рака посредством индукции иммунного ответа путем введения дендритных клеток, экспрессирующих гетерологичные белки. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0104] В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки будут аллогенными по отношению к субъекту, которому их вводят, и в таком качестве не ограничены по экспрессии HLA. Аллогенная природа клеток в сравнении с субъектом является дополнительным преимуществом при установлении улучшенного противоопухолевого эффекта.

[0105] В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки могут быть аутологичными по отношению к субъекту, которому их вводят.

[0106] Таким образом, без ограничения теорией, аспекты настоящего изобретения относятся к предоставлению пациенту дендритных клеток, экспрессирующих гетерологичные белки (например, рекомбинантных аллоДК), чтобы вызвать у пациента улучшенный иммунный ответ против рака (опухоли). Способы и композиции, описанные в настоящем изобретении, имеют множество преимуществ по сравнению с предшествующими композициями и способами, включая отсутствие необходимости совместного культивирования с питающими клетками, а также сводят к минимуму риски контаминации клеточной композиции из-за короткого времени культивирования/инкубирования *in vitro* рекомбинантных аллоДК и, необязательно, нагрузку аутологичными антигенами или антигенами "доступными в продаже", а также простоту и скорость получения и доставки клеточной композиции пациенту, наряду с минимальными побочными эффектами от применения клеточной композиции, которые обычно имеют только Степень 1 (или еще меньшими побочными эффектами). Такие рекомбинантные алло-ДК клетки и композиции обеспечивают дополнительное преимущество, вызывая как клеточный, так и гуморальный иммунный ответ у пациента. Кроме того, аллореактивность реципиента против несовпадающих по HLA ДК будет усиливать опухолеспецифичный иммунный ответ. Эти способы также служат для обеспечения "эффекта вакцины", обучая иммунные клетки реципиента, пациента аналогичным образом распознавать и уничтожать раковую опухоль-мишень, а также усиливая клеточные и гуморальные ответы реципиента. В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий клетки, рассматривает клетки как чужеродные и вызывает иммунный ответ против клеток, который можно назвать отторжением клеток. Такое "отторжение" может усиливать опухолеспецифичный иммунный ответ у субъекта.

[0107] Термин "антитело" в рамках изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, которая специфично связывается с антигеном. Антитела могут быть интактными иммуноглобулинами, полученными из природных источников или из рекомбинантных источников, и могут быть иммунореактивными частями интактных иммуноглобулинов. Антитела могут существовать во множестве форм включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, Fv, Fab и F(ab)₂, а также одноцепочечные антитела и гуманизированные антитела.

[0108] Термин "фрагмента антитела" относится к части интактного антитела и относится к определяющим антиген вариабельным областям интактного антитела. Примеры фрагментов антитела включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv фрагменты, линейные антитела, scFv антитела и мультиспецифичные антитела, сформировался из фрагментов антител.

[0109] Термин "антиген" в рамках изобретения определен как молекула, которая вызывает иммунный ответ. Этот иммунный ответ может включать либо продукцию антител, либо активацию специфических иммунологически компетентных клеток, либо и то, и другое. Антиген также может использоваться *in vitro* для активации ДК, что сравнимо с иммунным ответом. Специалисту будет понятно, что любая макромолекула, включая практически все белки или пептиды, может служить в качестве антигена. Кроме того, антигены могут происходить из рекомбинантной или геномной ДНК. Специалисту будет понятно, что любая ДНК, которая содержит нуклеотидные последовательности или неполную нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, который вызывает иммунный ответ, кодирует таким образом "антиген", как этот термин используется в настоящем изобретении. Кроме того, специалист в данной области поймет, что антиген не должен обязательно кодироваться исключительно полноразмерной нуклеотидной последовательностью гена. Совершенно очевидно, что варианты осуществления включают, но не ограничиваются применением неполных нуклеотидных последовательностей больше чем одного гена, и что такие нуклеотидные последовательности расположены в различных комбинациях, чтобы вызывать требуемый иммунный ответ. Более того, специалист поймет, что антиген вовсе не должен обязательно кодироваться "геном". Совершенно очевидно, что антиген может быть получен синтетически или может быть получен из биологического образца. Такой биологический образец может включать, но не ограничивается образцом ткани, образцом опухоли, клеткой или биологической жидкостью. Как описано в настоящем изобретении, антиген может быть лизатом опухолевых клеток. Примеры лизатов опухолевых клеток включают, без ограничения перечисленными, лизаты, описанные в настоящем изобретении, лизаты, полученные из биопсий или резецированных опухолей. Способы получения лизатов известны, и можно использовать любой метод.

[0110] Термин "рак" в рамках изобретения определен как заболевание, характеризующееся быстрым и неконтролируемым ростом аберрантных клеток. Раковые клетки могут распространяться локально или через кровоток и лимфатическую систему в

другие части тела. Примеры различных форм рака включают, без ограничения перечисленными, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак кожи, рак поджелудочной железы, рак толстой и прямой кишки, рак почки, рак печени, рак головного мозга, лимфому, лейкоз, рак легкого и т.п.

[0111] Формы рака, которые можно лечить, включают опухоли, которые не васкуляризированы или еще не васкуляризированы в существенной степени, а также васкуляризированные опухоли. Типы рака, подлежащие лечению рекомбинантными дендритными клетками, описанными в настоящем изобретении, включают, без ограничения перечисленными, карциному, бластому и саркому, а также некоторые лейкозные или лимфоидные злокачественные новообразования, доброкачественные и злокачественные опухоли, и злокачественные новообразования, например, саркомы, карциномы и меланомы. Также включены опухоли/злокачественные опухоли взрослых и детские опухоли/злокачественные опухоли.

[0112] Солидные опухоли представляют собой аномальные массы ткани, которые обычно не содержат кисты или жидкость. Солидные опухоли могут быть доброкачественными и злокачественными. Различные типы солидных опухолей называются по типу клеток, которые их формируют (например, саркомы, карциномы и лимфомы). Примеры солидных опухолей, таких как саркомы и карциномы, включают фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому и другие саркомы, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, карциному толстой кишки, лимфоидное злокачественное новообразование, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак легкого, рак яичника, рак предстательной железы, гепатоцеллюлярную карциному, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, медуллярную карциному щитовидной железы, папиллярную карциному щитовидной железы, феохромоцитому, карциному слюнных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, опухоль яичка, семиному, карциному мочевого пузыря, меланому и опухоли ЦНС (такие как глиому (например, глиому ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластому (также известную как мультиформная глиобластома), астроцитому, лимфому ЦНС, герминому, медуллобластому, шванному, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, менангиому, нейробластому, ретинобластому и метастазы в головной мозг).

[0113] Термин "противоопухолевое действие" в рамках изобретения относится к биологическому действию, которое может проявляться уменьшением объема опухоли, уменьшением количества опухолевых клеток, уменьшением количества метастазов, увеличением прогнозируемой продолжительности жизни или улучшением различных физиологических симптомов, связанных с онкологическим состоянием.

"Противоопухолевое действие" также может проявляться в способности рекомбинантных клеток и терапевтических композиций предотвращать возникновение опухоли в первичной области локализации.

[0114] В рамках изобретения термин "аутологичный" относится к любому материалу, полученному от того же лица, которому его позже предполагают повторно вводить.

[0115] "Аллогенный" относится к образцу (трансплантату, клетке или популяции клеток), полученному от другого животного того же вида, которому позже вводят данный образец. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные дендритные клетки не совпадают по HLA по сравнению с субъектом, получающим рекомбинантные дендритные клетки, в отличие от ситуаций при трансплантации почек и костного мозга, где совпадение по HLA-A, -B и -DR способствует выживанию трансплантата. В настоящих способах лечения рака и/или усиления, и/или улучшения иммунного ответа рекомбинантные дендритные клетки, экспрессирующие CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, могут привлекать Т-клетки и, например, вызывать гуморальные иммунные ответы, которые служат для направленного воздействия на раковые клетки, связываются с ними и убивают их, высвобождая антигены опухолевых клеток. Этот цикл самостоятельно повторяется с аллогенными рекомбинантными дендритными клетками, пока они не будут уничтожены иммунными ответами клеток реципиента. Это может происходить, например, в течение от приблизительно 4 до приблизительно 7 дней (и, возможно, в течение более длительного периода от приблизительно 4 до приблизительно 15 дней). Таким образом, риск РТПХ (реакции трансплантат против хозяина) снижается или отсутствует при такой короткой продолжительности жизни аллогенных рекомбинантных ДК. Однако в процессе распознавания и уничтожения опухолевых клеток и высвобождения антигенов в течение этого периода времени от приблизительно 4 до приблизительно 7 дней аллогенные клетки, в некоторых вариантах осуществления, могут служить для вакцинации дендритных клеток и других иммунных клеток реципиента для распознавания и уничтожения опухолевых клеток. См. дополнительно обзорную статью *Cancer Sci.* 2019 Jan; 110(1):16-22, которая полностью включена в настоящее описание посредством отсылки. Индукция противоопухолевого иммунитета представляет собой циклический процесс, который может быть самораспространяющимся. Он может усиливать и продлевать Т-клеточные ответы против раковых клеток. Он также содержит несколько ингибирующих факторов для остановки цикла, когда клетки-мишени (раковые клетки) уничтожаются. Цикл можно разделить на 7 стадий, как показано на Фиг. 1С, начиная с высвобождения раковых антигенов из раковых клеток и заканчивая уничтожением раковых клеток. АПК, антигенпрезентирующая клетка; ДК, дендритная клетка.

[0116] "Заболевание" представляет собой состояние здоровья субъекта, при котором субъект не может поддерживать гомеостаз, и при котором, если тяжесть заболевания не уменьшается, здоровье животного продолжает ухудшаться. В отличие от

этого, "нарушение" у субъекта является таким состоянием здоровья, при котором субъект способен поддерживать гомеостаз, но при котором состояние здоровья субъекта менее благоприятное, чем оно было бы при отсутствии нарушения. При отсутствии лечения заболевание не будет обязательно вызывать дальнейшее ухудшение состояния здоровья субъекта.

[0117] "Кодирующий" относится к неотъемлемому свойству конкретных последовательностей нуклеотидов в полинуклеотиде, таком как ген, кДНК или мРНК, служить в качестве матриц для синтеза других полимеров и макромолекул в биологических процессах, имеющих определенную последовательность нуклеотидов (т.е. рРНК, тРНК и мРНК), или определенную последовательность аминокислот, и вытекающим из этого биологическим свойствам. Таким образом, ген кодирует белок, если транскрипция и трансляция мРНК, соответствующей этому гену, приводит к синтезу белка в клетке или другой биологической системе. Как кодирующая цепь, нуклеотидная последовательность которой идентична последовательности мРНК и обычно представлена в списках последовательностей, так и некодирующая цепь, используемая в качестве матрицы для транскрипции гена или кДНК, может называться кодирующей белок или другой продукт этого гена или кДНК. В рамках изобретения вектор, который кодирует интересующий белок, относится к вектору, содержащему нуклеотидную последовательность, которая кодирует этот белок или белки.

[0118] В рамках изобретения термин "экзогенный" относится к любому материалу, введенному извне или произведенному вне организма, клетки, ткани или системы. Белок, называемый гетерологичным белком, экспрессируется экзогенным материалом (векторами, нуклеотидными последовательностями и т.п.), который был введен в организм, клетку, ткань или систему. Во избежание неопределенности следует отметить, что гетерологичный белок, гетерологичный вектор или гетерологичная нуклеотидная молекула - не те же, которые могут присутствовать в нативном, немодифицированном геноме организма, клетки, ткани или системы. Гетерологичный белок, вектор или нуклеотидная последовательность, которые могут иметь такую же последовательность или последовательность, похожую на последовательность, уже присутствующую в организме, клетке, ткани или системе, экспрессируется из положения или последовательности, которые отличаются у нативной последовательности, обнаруженной в геноме этого организма, клетки, ткани или системы.

[0119] Термин "экспрессия" в рамках изобретения определен как транскрипция и/или трансляция конкретной нуклеотидной последовательности, направляемая ее промотором.

[0120] "Вектор экспрессии" относится к вектору, включающему рекомбинантный полинуклеотид, включающий последовательности контроля экспрессии, функционально связанные с экспрессируемой нуклеотидной последовательностью. Вектор экспрессии включает достаточное количество цис-действующих элементов для экспрессии; другие элементы для экспрессии могут быть предоставлены клеткой-хозяином или в системе

экспрессии *in vitro*. Векторы экспрессии включают все векторы, известные в уровне техники, такие как космиды, плазмиды (например, голые или содержащиеся в липосомах) и вирусы (например, лентивирусы, ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые включают рекомбинантный полинуклеотид.

[0121] "Гомологичный" или "гомология" относится к подобию последовательностей или идентичности последовательностей двух полипептидов или двух молекул нуклеиновой кислоты. Если положение в обеих из двух сравниваемых последовательностей занимает одно и то же основание или аминокислотная мономерная субъединица, например, если положение в каждой из двух молекул ДНК занимает аденин, то молекулы являются гомологичными в этом положении. Процент гомологии двух последовательностей является функцией количества совпадающих или гомологичных положений между двумя последовательностями, деленного на количество сравниваемых положений $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений в двух последовательностях совпадают или являются гомологичными, то тогда две последовательности гомологичны на 60%. Например, ДНК последовательности АТТГСС и ТАТГГС обладают 50% гомологией. Как правило, сравнение проводят, когда две последовательности выровнены для получения максимальной гомологии.

[0122] Термин "иммуноглобулин" или "Ig" в рамках изобретения определен как класс белков, функционирующих как антитела. Антитела, экспрессируемые В-клетками, иногда называют ВСR (В-клеточный рецептор) или антигенным рецептором. В этот класс белков входит пять членов: IgA, IgG, IgM, IgD и IgE.

[0123] "Выделенный" означает измененный или удаленный из естественного состояния. Например, нуклеиновая кислота или пептид, существующий в естественном состоянии у живого животного, не являются "выделенными", но та же нуклеиновая кислота или пептид, частично или полностью отделенные от сопутствующих материалов из его естественного состояния, являются "выделенными". Выделенная нуклеиновая кислота или белок могут существовать по существу в очищенной форме или могут существовать в ненативной среде, такой как, например, клетка-хозяин. "Выделенный" биологический компонент (такой как нуклеиновая кислота, белок или клетка) был по существу отделен или очищен от других биологических компонентов (таких как клеточный дебрис, другие белки, нуклеиновые кислоты или типы клеток). Биологические компоненты, которые были "выделены", включают компоненты, очищенные с помощью стандартных способов очистки.

[0124] Предупреждение, лечение или уменьшение интенсивности заболевания: "Предупреждение" заболевания относится к ингибированию полного развития заболевания. "Лечение" относится к терапевтическому вмешательству, которое облегчает признак или симптом заболевания или патологического состояния после начала его развития. "Уменьшение интенсивности" относится к снижению числа или тяжести признаков или симптомов заболевания.

[0125] Химиотерапия включает лечение химическим веществом (таким как

цитотоксическое средство) с терапевтической применимостью для лечения заболеваний, характеризующихся ростом аномальных клеток, таких как опухоли, неоплазии, рак и псориаз. Примеры химиотерапии включают химиотерапии, описанные в настоящем изобретении, но не ограничиваются ими.

[0126] В рамках изобретения "рекомбинантный" обычно относится к следующему: рекомбинантная нуклеиновая кислота или белок имеет последовательность, которая не встречается в природе, или последовательность, полученную путем искусственной комбинации двух, в ином случае отдельных, сегментов последовательностей. Эта искусственная комбинация часто достигается путем химического синтеза или искусственной манипуляции выделенными сегментами нуклеиновых кислот, например, методами генной инженерии.

[0127] В настоящем изобретении используются следующие сокращения для оснований стандартных нуклеиновых кислот. "А" относится к аденозину, "С" относится к цитозину, "G" относится к гуанозину, "Т" относится к тимидину, и "U" относится к уридину.

[0128] Термин "лейкоциты" или "белая кровяная клетка" в рамках изобретения относится к любой иммунной клетке, включая моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и лимфоциты. Термин "лимфоциты" в рамках изобретения относится к клеткам, обычно присутствующим в лимфе, и включает естественные киллерные клетки (НК-клетки), Т-клетки и В-клетки. Специалисту в данной области будет понятно, что перечисленные выше типы иммунных клеток можно разделить на дополнительные подгруппы.

[0129] Термин "инфильтрирующие опухоль лейкоциты" в рамках изобретения относится к лейкоцитам, которые присутствуют в солидной опухоли.

[0130] Термин "образец крови" в рамках изобретения относится к любому образцу, приготовленному из крови, такому как плазма крови, клетки крови, выделенные из крови, и т.д.

[0131] Термин "очищенный образец" в рамках изобретения относится к любому образцу, в котором обогащено одна или более субпопуляций клеток. Образец может быть очищен путем удаления или выделения клеток по их характеристикам, таким как размер, экспрессия белков и т.д.

[0132] Фармацевтически приемлемые растворители. Фармацевтически приемлемые носители (растворители), используемые в настоящем описании, являются стандартными. В Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975) описаны композиции и составы, подходящие для фармацевтической доставки одной или более терапевтических композиций, а также дополнительных фармацевтических средств.

[0133] В большинстве случаев природа подходящего носителя или растворителя для доставки будет зависеть от конкретного используемого способа введения. Например, составы для парентерального введения обычно содержат жидкости для инъекций, которые

включают фармацевтически и физиологически приемлемые жидкости, такие как воду, физиологический раствор, сбалансированные солевые растворы, водный раствор декстрозы, глицерин или т.п. в качестве носителя. Для твердых композиций (например, порошков, пилюль, таблеток или капсул) обычные нетоксичные твердые носители могут включать, например, фармацевтические сорта маннита, лактозы, крахмала или стеарата магния. В дополнение к биологически нейтральным носителям вводимые фармацевтические композиции могут содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие вещества, консерванты, рН буферные вещества и т.п., например, ацетат натрия или сорбитан монолаурат.

[0134] В некоторых вариантах осуществления композиции, будь то растворы, суспензии или другая подобная форма, могут включать одно или более из следующего: ДМСО, стерильные разбавители, такие как вода для инъекций, солевой раствор, предпочтительно физиологический раствор, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды, которые могут служить в качестве растворителя или суспендирующей среды, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатообразователи, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота; буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и регуляторы тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза.

[0135] В рамках изобретения "иммунодефицитный" означает отсутствие по меньшей мере одной важной функции иммунной системы. В данном контексте "иммунодефицитный" субъект (такой как человек) является субъектом, у которого отсутствуют определенные компоненты иммунной системы или функции конкретных компонентов иммунной системы (таких как, например, В-клетки, Т-клетки, НК-клетки или макрофаги). В некоторых случаях субъект с иммунодефицитом содержит одно или более генетических изменений, которые предотвращают или ингибируют развитие функциональных иммунных клеток (таких как В-клетки, Т-клетки или НК-клетки). В некоторых примерах генетическое изменение присутствует в рецепторе IL17 или IL17.

[0136] В рамках изобретения, иммуносупрессированный относится к снижению активности или функции иммунной системы. Субъект может быть иммуносупрессированным, например, в результате лечения иммунодепрессантным соединением или в результате заболевания или нарушения (например, иммунодепрессия, вызванная ВИЧ-инфекцией или генетическим нарушением). В некоторых случаях иммуносупрессия происходит в результате генетической мутации, которая предотвращает или ингибирует развитие функциональных иммуноцитов, таких как Т-клетки.

[0137] Примеры типов рака и пролиферативных нарушений, которые можно лечить с применением эффективного количества композиций рекомбинантных дендритных

клеток и связанных с ними способов, описанных в настоящем изобретении, включают, без ограничения перечисленными, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, опухоль Юинга, карциному толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак предстательной железы, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокарциному, почечно-клеточную карциному, гепатому, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак матки, опухоль яичка, карциному легкого, мелкоклеточную карциному легкого, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, олигодендроглиому, меланому, нейробластому, ретинобластому, дисплазию и гиперплазию. Лечение и/или профилактика рака включает, без ограничения перечисленным, облегчение одного или более симптомов, связанных с раком, замедление или уменьшение прогрессирования рака, стимулирование регрессии рака и/или стимулирование иммунного ответа.

[0138] В некоторых других вариантах осуществления "терапевтически эффективное количество" является таким количеством композиции рекомбинантных дендритных клеток, которое приводит к уменьшению опухоли, роста или распространения рака по меньшей мере на 2,5%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% у пациента или животного, которому была введена композиция или клетки, описанные в настоящем изобретении, в сравнении с ростом опухоли или распространением рака у пациента (или животного) или группы пациентов (или животных), которым не вводили композицию или клетки согласно изобретению.

[0139] В некоторых вариантах осуществления композиции рекомбинантных дендритных клеток могут вводить одновременно с противомикробными, противовирусными и другими терапевтическими средствами. В альтернативе композиции рекомбинантных дендритных клеток могут вводить в выбранное время до момента введения противомикробных, противовирусных и других терапевтических средств.

Комбинации с антителами

[0140] В некоторых вариантах осуществления композиции рекомбинантных дендритных клеток могут вводить одновременно с антителами, специфичными по отношению к выбранному типу рака. В альтернативе композиции рекомбинантных дендритных клеток могут вводить в выбранное время до момента введения антител, специфичных по отношению к выбранному типу рака. Антитела, специфичные по отношению к выбранному типу рака, включают любое антитело, одобренное для лечения рака. Примеры включают трастузумаб (Герцептин) для лечения рака молочной железы, ритуксимаб (Ритуксан) для лечения лимфомы и цетуксимаб (Эрбитукс) для лечения плоскоклеточной карциномы головы и шеи.

[0141] Дополнительные примеры таких средств на основе антител включают

ингибиторы PD-1 или PD-L1 (B7-H1), такие как антитела к PD-1, включающие ниволумаб (Ниволумаб, Bristol-Myers Squibb) и пембролизумаб/ламбролизумаб, также известный как МК-3475 (Китруда, Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune), и антитела к PD-L1, включающие MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718 C (Merck). Другие ингибиторы контрольных точек включают антагонисты CTLA-4, такие как антитела к CTLA-4. Примером антитела к CTLA4 является Ервой™ (ипилимумаб), выпускаемый Bristol-Myers Squibb. Другие примеры антител к CTLA-4 включают тремелимумаб (Pfizer), Тицилимумаб (AstraZeneca) и AMG-224 (Glaxo Smith Kline). Комбинации с любыми двумя из этих антител могут также быть показаны в некоторых случаях.

[0142] В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки выделяют из разных источников, включая мононуклеарные клетки периферической крови.

[0143] "Мононуклеарные клетки периферической крови", "МКПК" или "мононуклеарные клетки" относятся к мононуклеарным клеткам, выделенным из периферической крови и используемым, как правило, для противораковой иммунотерапии. Мононуклеарные клетки периферической крови могут быть получены из человеческой крови, собранной с помощью известных методов, таких как метод разделения в градиенте плотности фиколл-гипака.

[0144] Согласно одному из примеров осуществления "мононуклеарные клетки периферической крови" могут быть получены у любого подходящего лица. Источник донорских клеток, включая такие источники, как мононуклеарные клетки периферической крови, используемые в настоящем изобретении, может, в некоторых вариантах осуществления, быть аллогенным по отношению к пациенту-реципиенту для выделения дендритных клеток с целью применения при лечении рака и в иммуностимулирующих способах, описанных в настоящем изобретении. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, донорский ингибирующий лиганд не совпадает с HLA пациента (например, реципиента).

[0145] В альтернативных вариантах осуществления источник донорских клеток, включая такие источники, как мононуклеарные клетки периферической крови, используемые в настоящем изобретении, является аутологичным по отношению к пациенту-реципиенту для выделения дендритных клеток с целью применения при лечении рака и в иммуностимулирующих способах, описанных в настоящем изобретении.

Источники клеток

[0146] МКПК могут быть выделены при центрифугировании в градиенте плотности фиколл-гипака образцов, полученных из утилизируемых, обезличенных фильтров для редукции лейкоцитов (Американский Красный Крест), или образцов донорской крови от здоровых добровольцев с получением информированного согласия. Описания популяций клеток, источников и способов отбора или обогащения требуемых типов клеток можно найти, например, в патенте США 9,347,044. Популяции клеток для применения в описанных в настоящем изобретении способах лечения млекопитающих

должны быть видоспецифическими, такими как клетки человека. Клетки могут быть получены от животного, например, пациента-человека. Если клетки получены от животного, они могут быть сначала стабилизированы в культуре, например, путем трансформации; или, более предпочтительно, они могли быть подвергнуты способам предварительной очистки. Например, популяцию клеток можно подвергнуть манипуляции посредством положительной или отрицательной селекции по экспрессии маркеров клеточной поверхности; стимуляции одним или более антигенами *in vitro* или *in vivo*; обработке одним или более биологическими модификаторами *in vitro* или *in vivo*; или комбинации любых из них или всех. В иллюстративном варианте осуществления популяцию клеток подвергают отрицательной селекции для истощения не-Т-клеток и/или определенных подтипов Т-клеток. Отрицательную селекцию можно проводить по экспрессии на клеточной поверхности различных молекул, включая В-клеточные маркеры, такие как CD19 и CD20; маркер моноцитов CD14; маркер NK-клеток CD56. В альтернативе популяция клеток может быть подвергнута отрицательной селекции на истощение не-CD34+ гемопоэтических клеток и/или определенных подтипов гемопоэтических клеток. Отрицательную селекцию могут проводить по экспрессии на клеточной поверхности различных молекул, например, при использовании смеси антител (например, к CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 и CD235a), которые могут использоваться для разделения других типов клеток, например, посредством MACS или колононого разделения.

[0147] Популяции клеток включают мононуклеарные клетки периферической крови, цельную кровь или ее фракции, содержащие смешанные популяции, клетки селезенки, клетки костного мозга, инфильтрирующие опухоль лимфоциты, клетки, полученные при лейкоферезе, биопсию ткани, лимфатические узлы, например, лимфатические узлы, дренирующие опухоль. Подходящие доноры включают иммунизированных доноров, неиммунизированных (наивных) доноров, обработанных или необработанных доноров. "Обработанный" донор - это донор, который подвергся воздействию одного или более биологических модификаторов. "Необработанный" донор не подвергался воздействию одного или более биологических модификаторов.

[0148] Способы получения популяций клеток, включающих моноциты (для созревания в ДК) или дендритные клетки, известны в уровне техники. Например, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) могут быть получены, как описано в соответствии со способами, известными в уровне техники. Примеры таких способов описаны, например, в Nair, Smita et al. *Current protocols in immunology* vol. Chapter 7 (2012): Unit7.32. doi:10.1002/0471142735.im0732s99.

[0149] Также можно получить образец клеток у субъекта, а затем обогатить его требуемым типом клеток. Например, МКПК могут выделять из крови, как описано в настоящем изобретении. Противоточное центрифугирование (элютриацию) можно использовать для обогащения моноцитов или дендритных клеток из МКПК. Клетки также могут быть выделены из других клеток при использованием различных методов, таких как

выделение и/или активация с использованием антитела, связывающегося с эпитопом на поверхности клетки нужного типа, например, в некоторых наборах для выделения Т-клеток используются конъюгированные с антителами сферы для активации клеток и затем колоночное разделение с такими же сферами. Другой способ, который может использоваться, включает отрицательный отбор с использованием антител к маркерам клеточной поверхности для селективного обогащения клеток определенного типа без активации клеток при связывании с рецептором.

[0150] Клетки костного мозга (клетки КМ) могут быть получены из гребня подвздошной кости, бедер, большеберцовых костей, позвоночника, ребер или других костномозговых полостей. Костный мозг могут забирать из организма пациента и выделять с помощью различных процедур разделения и промывки. Известная процедура выделения клеток костного мозга включает следующие стадии: а) центрифужное разделение суспензии костного мозга на три фракции и сбор промежуточной фракции или лейкоцитомоноцитарного слоя; б) фракцию лейкоцитомоноцитарного слоя со стадии (а) еще раз центрифугируют в разделяющей жидкости, обычно в Фиколле (торговая марка Pharmacia Fine Chemicals AB), и собирают промежуточную фракцию, содержащую клетки костного мозга; и с) промывка фракции, собранной на стадии (б), для извлечения пригодных к повторной трансфузии клеток костного мозга. Кроме того, клетки КМ можно собирать при мобилизации с последующим лейкоферезом.

[0151] Дендритные клетки (ДК) являются сторожевыми антигенпрезентирующими клетками иммунной системы. Эти клетки обладают способностью принимать антигенный материал из своей среды и затем инициировать мощные иммунные ответы, и являются идеальными кандидатами для доставки вакцин для иммунотерапии рака. Дендритные клетки включают гетерогенную популяцию клеток с характерной морфологией и широким распределением в тканях. ДК экспонируют такие маркеры клеточной поверхности, как CD1c⁺, CD14⁺, CD141⁺, CD16⁺ или HLA-DR⁺.

[0152] В частности, дендритные клетки действуют как антигенпрезентирующие клетки при эндоцитозе экзогенных белков, которые затем процессируются и презентуются в виде эпитопов на их поверхности в сочетании с антигенами МНС классов I и II. Антигенпрезентирующие дендритные клетки могут распознаваться цитотоксическими Т-клетками и Т-хелперами. Состояние созревания дендритных клеток важно для их фагоцитозной/эндоцитозной активности. Незрелые дендритные клетки обычно являются наиболее эффективными клетками для нагрузки антигенами.

[0153] Незрелые дендритные клетки относятся к дендритным клеткам, в которых экспрессия некоторых клеточных маркеров CD1a, CD14 и CD83 характеризуется высокой экспрессией CD1a (больше 50% ДК в популяции являются положительными на CD1a), отсутствием экспрессии или низкой экспрессией CD14 (меньше 15% ДК в популяции являются положительными на CD14), и низкой экспрессией CD83 (меньше 25% ДК в популяции являются положительными на CD83).

[0154] В некоторых вариантах осуществления ДК получают из любой ткани, в

которой они присутствуют, включая нелимфоидные ткани, такие как эпидермис кожи (клетки Лангерганса) и лимфоидные ткани, такие как селезенку, костный мозг, лимфатические узлы и тимус, а также сердечно-сосудистую систему, включая кровь и периферическую кровь. Поскольку ДК присутствуют в малых количествах в любых тканях, в которых они находятся, ДК может быть обогащены или выделены для применения. Любая из многих процедур, включающих повторяющееся разделение в градиенте плотности, положительный отбор, отрицательный отбор или комбинацию этого, может использоваться для получения обогащенных популяций ДК. После получения ДК, их могут культивировать в подходящей среде для размножения популяции клеток и/или поддержания ДК в состоянии для оптимального захвата, процессинга и презентации антигена.

[0155] В некоторых вариантах осуществления ДК могут быть аутологичными по отношению к субъекту, страдающему раком, то есть ДК, которые вводят субъекту, могут быть выделены у того же субъекта. В других вариантах осуществления ДК могут быть аллогенными по отношению к субъекту, страдающему раком. В некоторых вариантах осуществления ДК, раскрытые в настоящем изобретении, могут относиться к любому подтипу, такому как миелоидные ДК, плазматоидные ДК, интерстициальные ДК, резидентные ДК лимфоидной ткани, фолликулярные ДК, CD14+ ДК и т.п.

[0156] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам разработки генетически модифицированных/рекомбинантных дендритных клеток, экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, которые могут использоваться для терапии рака.

[0157] CD40L представляет собой мембранный белок II типа массой 35 кДа и является членом семейства генов фактора некроза опухоли (ФНО), экспрессируется на поверхности Т-клеток при распознавании антигена. Участие CD40L важно при активации Т-клеток, необходимой для индукции эффективного защитного иммунитета против опухолевых аутоантигенов (см. публикацию *Front Immunol.* 2011; 2:31, которая полностью включена в настоящее описание посредством отсылки). Полную информацию о последовательности CD40L человека можно найти в NCBI, ID гена: 959.

[0158] CXCL13 представляет собой хемокин, экспрессируемый в фолликулярных стромальных клетках лимфоидных органов, макрофагах в брюшной и плевральной полостях и в миелоидных дендритных клетках. Было показано, что он в первую очередь связывается с рецептором CXCR5, сопряженным с G-белком. CXCR5 экспрессируется на В-клетках и некоторых подтипах Т-клеток (включая фолликулярные Т-хелперы, подтип циркулирующих CD4 Т-клеток памяти и другие популяции Т-клеток, не полностью дифференцированных как Т-хелпер 1 (Th1) или Т-хелпер 2 (Th2)). Физиологическая роль CXCL13 была продемонстрирована при колокализации В- и Т-клеток с воздействием на хоуминг аутореактивных В1-клеток в пейеровы бляшки и другие участки воспаления, а также в привлечении Th-клеток во вторичные лимфоидные органы для Т-зависимой продукции антител (см. публикацию *Front Immunol.* 2016; 7:225, которая полностью

включена в настоящее описание посредством отсылки). Полную информацию о последовательностях CXCL13 человека можно найти в NCBI, ID гена: 10563.

[0159] CD93 человека (hCD93) представляет собой трансмембранный гликопротеин типа 1, расположенный на хромосоме 20, p11.21. Этот белок участвует во взаимодействии генов в ходе развития В-клеток и фагоцитоза. CD93 экспрессируется в миелоидных линиях дифференцировки, гемопоэтических стволовых клетках, НК-клетках, тромбоцитах, микроглии и эндотелиальных клетках. Полную информацию о последовательности CD93 человека можно найти в NCBI, ID гена: 22918.

[0160] В некоторых вариантах осуществления дендритная клетка включает одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и/или CXCL13. Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CD40L, может быть из любого источника, такого как человек, мышь, крыса или свинья, или любое другое млекопитающее. Последовательность нуклеиновой кислоты CD40L человека раскрыта в SEQ ID NO:1. Аналогичным образом, гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CXCL13, может быть из любого источника, такого как человек, мышь, крыса или свинья, или любое другое млекопитающее. Последовательность нуклеиновой кислоты CXCL13 человека раскрыта в SEQ ID NO:2.

[0161] В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки могут дополнительно включать гетерологичную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую CD93. Гетерологичная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая CD93, может быть из любого источника, такого как человек, мышь, крыса или свинья, или любое другое млекопитающее. Последовательность нуклеиновой кислоты CD93 человека раскрыта в SEQ ID NO:3.

[0162] Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие белки, тем не менее, могут быть другими последовательностями из-за вырожденной природы генетического кода. Такие последовательности нуклеиновых кислот являются неограничивающими примерами, и могут использоваться другие.

[0163] Соответствующие человеческие аминокислотные последовательности являются следующими: CD40L человека: SEQ ID NO:4; CXCL13 человека: SEQ ID NO:5; и CD93 человека: SEQ ID NO:6. В некоторых вариантах осуществления белок включает консервативную замену.

[0164] Следующие последовательности могут использоваться в качестве ссылки по всему тексту настоящей заявки в соответствующих случаях:

[0165] В некоторых вариантах осуществления CD40L человека кодируется последовательностью:

```
ATGATCGAAACATACAACCAAACCTTCTCCCCGATCTGCGGCCACTGGACTGC
CCATCAGCATGAAAATTTTATGTATTTACTTACTGTTTTTCTTATCACCCAGATGAT
TGGGTCAGCACTTTTTGCTGTGTATCTTCATAGAAGGTTGGACAAGATAGAAGATGA
AAGGAATCTTCATGAAGATTTTGTATTCATGAAAACGATACAGAGATGCAACACAG
GAGAAAGATCCTTATCCTTACTGAACTGTGAGGAGATTAAAAGCCAGTTTGAAGGC
```

TTTGTGAAGGATATAATGTTAAACAAAGAGGAGACGAAGAAAGAAAACAGCTTTGA
 AATGCAAAAAGGTGATCAGAATCCTCAAATTGCGGCACATGTCATAAGTGAGGCCA
 GCAGTAAAACAACATCTGTGTTACAGTGGGCTGAAAAAGGATACTACACCATGAGC
 AACAACTTGGTAACCCTGGAAAATGGGAAACAGCTGACCGTTAAAAGACAAGGACT
 CTATTATATCTATGCCCAAGTCACCTTCTGTTCCAATCGGGAAGCTTCGAGTCAAGC
 TCCATTTATAGCCAGCCTCTGCCTAAAGTCCCCCGGTAGATTTCGAGAGAATCTTACT
 CAGAGCTGCAAATACCCACAGTTCGCCAAACCTTGCGGGCAACAATCCATTCACTT
 GGGAGGAGTATTTGAATTGCAACCAGGTGCTTCGGTGTGTGTCAATGTGACTGATCC
 AAGCCAAGTGAGCCATGGCACTGGCTTCACGTCCTTTGGCTTACTCAAACCTC (SEQ
 ID NO: 1)

[0166] В некоторых вариантах осуществления CXCL13 человека кодируется последовательностью:

ATGAAGTTCATCTCGACATCTCTGCTTCTCATGCTGCTGGTCAGCAGCCTCTC
 TCCAGTCCAAGGTGTTCTGGAGGTCTATTACACAAGCTTGAGGTGTAGATGTGTCCA
 AGAGAGCTCAGTCTTTATCCCTAGACGCTTCATTGATCGAATTCAAATCTTGCCCCG
 TGGGAATGGTTGTCCAAGAAAAGAAATCATAGTCTGGAAGAAGAACAAGTCAATTG
 TGTGTGTGGACCCTCAAGCTGAATGGATACAAAGAATGATGGAAGTATTGAGAAAA
 AGAAGTTCTTCAACTCTACCAGTTCAGTGTTTAAGAGAAAGATTCCC (SEQ ID NO:
 2)

[0167] В некоторых вариантах осуществления CD93 человека кодируется последовательностью:

ATGGCCACCTCCATGGGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCCTGACCCAGCC
 CGGGGCGGGGACGGGAGCTGACACGGAGGCGGTGGTCTGCGTGGGGACCGCCTGCT
 ACACGGCCCACTCGGGCAAGCTGAGCGCTGCCGAGGCCCAGAACCACTGCAACCAG
 AACGGGGGCAACCTGGCCACTGTGAAGAGCAAGGAGGAGGCCCAGCACGTCCAGC
 GAGTACTGGCCCAGCTCCTGAGGCGGGAGGCAGCCCTGACGGCGAGGATGAGCAAG
 TTCTGGATTGGGCTCCAGCGAGAGAAGGGCAAGTGCCTGGACCCTAGTCTGCCGCT
 GAAGGGCTTCAGCTGGGTGGGCGGGGGGAGGACACGCCTTACTCTAACTGGCACA
 AGGAGCTCCGGAACCTCGTGCATCTCCAAGCGCTGTGTGTCTCTGCTGCTGGACCTGT
 CCCAGCCGCTCCTTCCCAGCCGCTCCCCAAGTGGTCTGAGGGCCCCTGTGGGAGCC
 CAGGCTCCCCCGGAAGTAACATTGAGGGCTTCGTGTGCAAGTTCAGCTTCAAAGGC
 ATGTGCCGGCCTCTGGCCCTGGGGGGCCAGGTCAGGTGACCTACACCACCCCTTC
 CAGACCACAGTTCCTCCTTGGAGGCTGTGCCCTTTGCCCTCTGCGGCCAATGTAGCC
 TGTGGGGAAGGTGACAAGGACGAGACTCAGAGTCATTATTTCTGTGCAAGGAGAA
 GGCCCCCGATGTGTTGACTGGGGCAGCTCGGGCCCCCTCTGTGTGCAAGGAGAA
 TGGCTGCAACTTCAACAATGGGGGCTGCCACCAGGACTGCTTTGAAGGGGGGGATG
 GCTCCTTCTCTGCGGCTGCCGACCAGGATTCGGCTGCTGGATGACCTGGTGACCT
 GTGCCTCTCGAAACCTTGCAGCTCCAGCCCATGTCGTGGGGGGGCCACGTGCGTCC
 TGGGACCCCATGGGAAAAACTACACGTGCCGCTGCCCCCAAGGGTACCAGCTGGAC
 TCGAGTCAGCTGGACTGTGTGGACGTGGATGAATGCCAGGACTCCCCCTGTGCCAG

GAGTGTGTCAACACCCCTGGGGGCTTCCGCTGCGAATGCTGGGTTGGCTATGAGCCG
 GGCGGTCCTGGAGAGGGGGCCTGTCAGGATGTGGATGAGTGTGCTCTGGGTCGCTC
 GCCTTGCGCCCAGGGCTGCACCAACACAGATGGCTCATTTCACTGCTCCTGTGAGGA
 GGGCTACGTCCTGGCCGGGGAGGACGGGACTCAGTGCCAGGACGTGGATGAGTGTG
 TGGGCCCCGGGGGGCCCCCTCTGCGACAGCTTGTGCTTCAACACACAAGGGTCTTCC
 ACTGTGGCTGCCTGCCAGGCTGGGTGCTGGCCCCAAATGGGGTCTCTTGCACCATGG
 GGCTGTGTCTCTGGGACCACCATCTGGGCCCCCGATGAGGAGGACAAAGGAGAG
 AAAGAAGGGAGCACCGTGCCCCGTGCTGCAACAGCCAGTCCCACAAGGGGGCCCCGA
 GGGCACCCCAAGGCTACACCCACCACAAGTAGACCTTCGCTGTCATCTGACGCCCC
 CATCACATCTGCCCCACTCAAGATGCTGGCCCCAGTGGGTCCCCAGGCGTCTGGAG
 GGAGCCAGCATCCATCACGCCACAGCTGCCTCTGGCCCCAGGAGCCTGCAGGTG
 GGGACTCCTCCGTGGCCACACAAAACAACGATGGCACTGACGGGCAAAAGCTGCTT
 TTATTCTACATCCTAGGCACCGTGGTGGCCATCCTACTCCTGCTGGCCCTGGCTCTGG
 GGCTACTGGTCTATCGCAAGCGGAGAGCGAAGAGGGAGGAGAAGAAGGAGAAGAA
 GCCCCAGAATGCGGCAGACAGTTACTCCTGGGTTCAGAGCGAGCTGAGAGCAGGG
 CCATGGAGAACCAGTACAGTCCGACACCTGGGACAGACTGC (SEQ ID NO: 3)

[0168] В некоторых вариантах осуществления CD40L человека включает аминокислотную последовательность:

MIETYNQTSRSAATGLPISMKIFMYLLTVFLITQMIGSALFAVYLHRRLDKIEDE
 RNLHEDFVFMKTIQRCNTGERSLSLLNCEEIKSQFEGFVKDIMLNKEETKKENSFEMQK
 GDQNPQIAAHVISEASSKTTSVLQWAEKGYTMSNNLVTLENGKQLTVKRQGLYYIYA
 QVTFCSNREASSQAPFIASLCLKSPGRFERILLRAANTHSSAKPCGQQSIHLGGVFELQPG
 ASVFNVTDPQSQVSHGTGFTSFGLLKL (SEQ ID NO: 4)

[0169] В некоторых вариантах осуществления CXCL13 человека включает аминокислотную последовательность:

MKFISTSLLLMLLVSSLSPVQGVLEVYYTSLRCRCVQESSVFIPRRFIDRIQILPRG
 NGCPRKEIIVWKKNKSIKVCVDPQAEWIQRMMEVLRKRSSSTLPVPVFKRKIP (SEQ ID
 NO: 5)

[0170] В некоторых вариантах осуществления CD93 человека включает аминокислотную последовательность:

MATSMGLLLLLLLLLLTPGAGTGADTEAVVCVGTACYTAHSGKLSAAEAQNHC
 NQNGGNLATVKSKEEAQHVRVLAQLLRREAALTARMSKFWIGLQREKKGKCLDPSLPL
 KGFSWVGGGEDTPYSNWHKELRNSCISKRCVSLLDLSQPLLPKRWSEGPCGSPGSP
 GSNIEGFVCKFSFKGMCRPLALGGPGQVTYTTPFQTTSSSLEAVPFASAANVACGEGDK
 DETQSHYFLCKEKAPDVFDWGSGLPCVSPKYGCNFNNGGCHQDCFEGGDGSFLCGCR
 PGFRLDDLVTCASRNPCSSSPCRGGATCVLPHGKNYTCRCPQGYQLDSSQLDCVDV
 DECQDSPAQECVNTPGGFRCECWVGYEPGGPEGACQDVDECALGRSPCAQGCTNT
 DGSFHCSCEEGYVLAGEDGTQCQDVDECVGGPLCDSLFCNTQGSFHCGCLPGWVLA
 PNGVSCTMGPVSLGPPSGPPDEEDKGEKEGSTVPRAATASPTRGPEGTPKATPTTSRPSL
 SSDAPITSAPLKMLAPSGSPGVWREPSIHHATAASGPQEPAGGDSSVATQNNDGTDGQK

LLLFYILGTVVAILLLLALALGLLVYRKRRRAKREEKKEKPKQNAADSYSWVPERAESRAMENQYSPTPGTDC (SEQ ID NO: 6).

[0171] В некоторых вариантах осуществления белок по меньшей мере на или приблизительно на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% гомологичен последовательностям, представленным в настоящем изобретении. "Консервативная аминокислотная замена" является заменой аминокислотного остатка аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, определены в уровне техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

[0172] Гетерологичные молекулы нуклеиновых кислот могут быть введены в дендритные клетки с помощью любых известных рекомбинантных технологий, известными в уровне техники, таких как липосомная трансфекция, химическая трансфекция, рекомбинация трансгенной ДНК, вирусная инфекция, вставка транспозона, вставка прыгающего гена, микроинъекция, электропорация, введение с помощью генной пушки и их комбинация. В некоторых вариантах осуществления для введения гетерологичных молекул нуклеиновых кислот могут использовать рекомбинантный аденовирусный вектор, рекомбинантный аденоассоциированный вектор, рекомбинантный ретровирусный вектор, рекомбинантный лентивирусный вектор или их комбинацию.

[0173] В некоторых вариантах осуществления могут использоваться способы экспрессии требуемых генов - CD40L, CXCL13 и CD93. Такие способы включают доставку системы CRISPR/Cas, TALEN и цинк-пальцевых нуклеаз. Например, системы TALEN и CRISPR/Cas могут использоваться для вставки специфических элементов регуляции транскрипции перед и после нативного гена. TALEN и CRISPR/Cas9 способны создавать одно- или двухцепочечные разрывы ДНК в определенных локусах. Это стимулирует направленную гомологией репарацию (HDR) с экзогенной матрицы, обеспечивая точную вставку элементов регуляции транскрипции для активации нативных генов. Нуклеазы CRISPR/Cas можно доставлять при использовании любых векторов доставки генов, таких как аденовирусный вектор, аденоассоциированный вектор, ретровирусный вектор, лентивирусный вектор или их комбинация.

[0174] В некоторых вариантах осуществления генетически модифицированные ДК, раскрытые в настоящем изобретении, можно культивировать в стандартных питательных средах при условиях окружающей среды, таких как температура, pH и т.п., и которые очевидны для специалистов в данной области.

[0175] В некоторых вариантах осуществления изобретения ДК с суперэкспрессией CD40L, CXCL13 и CD93 могут быть активированы или подвергнуты контакту с антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген может быть опухолевым антигеном или вирусным антигеном. Неограничивающие примеры опухолевого антигена включают антиген, экспрессируемый клеткой рака толстой и прямой кишки, клеткой рака молочной железы, клеткой рака яичника, клеткой рака поджелудочной железы, клеткой рака головы и шеи, клеткой рака мочевого пузыря, клеткой рака печени, клеткой рака почки, клеткой меланомы, клеткой рака желудочно-кишечного тракта, клеткой рака предстательной железы, клеткой мелкоклеточного рака легкого, клеткой немелкоклеточного рака легкого, клеткой саркомы, клеткой глиобластомы, клеткой Т- и В-клеточной лимфомы, клеткой рака эндометрия или клеткой рака шейки матки.

[0176] В некоторых вариантах осуществления антиген может быть лизатом раковой (опухолевой) клетки, и при этом лизат раковой клетки может быть аллогенным или аутологичным по отношению к дендритной клетке. В некоторых вариантах осуществления лизат раковой клетки может быть лизатом раковой клетки меланомы, таким как лизат клетки DDM-1.7, лизат клетки DDM-1.13, или их комбинацией.

[0177] Многочисленные методы стимуляции или активации дендритных клеток антигеном известны в уровне техники. В некоторых вариантах осуществления антиген могут добавлять к культивируемым дендритным клеткам при условиях, способствующих жизнеспособности клеток, после чего клеткам дают достаточное количество времени для захвата и процессинга антигена и экспрессии пептидов антигена на клеточной поверхности или в сочетании с МНС класса I или класса II, в течение периода приблизительно 24 часа (от приблизительно 18 до приблизительно 30 часов, предпочтительно 24 часа). Дендритные клетки также можно подвергнуть контакту с антигеном путем их трансфекции ДНК, кодирующей антиген. ДНК экспрессируется, а антиген предположительно процессируется по цитозольному пути/пути Класса I.

[0178] В некоторых вариантах осуществления выделенные пептиды могут использоваться для стимуляции или активации ДК. Пептид вводят любым из различных методов, включая инкубацию пептида с дендритной клеткой, инкубирование белка, включающего пептид, с ДК, трансдукцию ДК (или размноженной популяции моноцитов-предшественников) геном, кодирующим пептид (или белок, включающий пептид), и т.п. Типичные антигены для применения в качестве пептидов получают из антигенов, экспрессируемых в клетке-мишени, таких как трансформированная клетка, раковая клетка, бактериальная клетка, паразитически инфицированная клетка или вирусно инфицированная клетка и т.п. Примеры включают, без ограничения, углеводы, такие как муцин, опухолевые антигены, пептиды, полученные из белка, выбранного из группы, состоящей из GAG ВИЧ, ENV ВИЧ, HER-2, MART-1, gp-100, PSA, HBV_s, HBV_s, HPV E6, HPV E7, тирозиназы, MAGE-1, tgp-1, микобактериальных антигенов и CEA, а также многих других. Опухолевые антигены, подходящие для презентации, включают, без ограничения, c-erb-β-2/HER2/neu, PEM/MUC-1, Int-2, Hst, BRCA-1, BRCA-2, усеченный

EGFRvIII, CEA, p53, ras, RK, Muc, Myb, OB-1, OB-2, BCR/ABL, GIP, GSP, RET, ROS, FIS, SRC, TRC, WTI, DCC, NF1, FAP, MEN-1, ERB-B1, MAGE-антигены и идиотипические иммуноглобулины (например, из В-клетки больного неходжкинской лимфомой). Антигенпрезентирующая активность дендритных клеток может быть улучшена при совместном культивировании с некоторыми цитокинами, такими как ФНО- α или ИЛ-1 α , или ИЛ-1 β .

[0179] Активированные дендритные клетки, раскрытые в настоящем изобретении, могут присутствовать в композиции, включающей физиологически приемлемые носители, эксципиенты, адъюванты или разбавители. Примером подходящих разбавителей являются нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. Подходящие носители включают водные изотонические стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью предполагаемого реципиента, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. В некоторых вариантах осуществления композиция может включать опухолевый антиген или вирусный антиген. В некоторых вариантах осуществления композиция не содержит какого-либо гетерологичного антигена. В некоторых вариантах осуществления композиция включает популяцию по меньшей мере приблизительно 10^5 дендритных клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 10^6 клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 10^7 клеток/мл или больше.

[0180] В некоторых вариантах осуществления активированные ДК могут замораживать (криоконсервировать) перед введением субъекту. В некоторых вариантах осуществления активированные ДК могут замораживать путем суспендирования клеток в среде, содержащей по меньшей мере 30% человеческой сыворотки и/или плазмы крови, и снижения температуры суспензии по меньшей мере до -80°C , тем самым замораживая ДК. В некоторых вариантах осуществления среда для замораживания представляет собой приблизительно 30% сыворотки и/или плазмы крови человека и приблизительно 10% вещества, предотвращающего образование кристаллов льда во время замораживания, например, ДМСО. В другом варианте осуществления суспензию ДК выдерживают при -80°C в течение по меньшей мере 24 часов, а затем переносят в жидкий азот на время хранения. В другом варианте осуществления суспензию ДК размораживают при температуре в пределах от 34°C до 41°C .

[0181] Также в настоящем изобретении раскрыты способы развития незрелых ДК из моноцитов и активацию незрелых ДК аллогенными или аутологичными лизатами опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления способ включает: (а) выделение моноцитов у субъекта; (б) суперэкспрессию одного или более генов, выбранных из CD40L, CXCL13 и CD93, в выделенных моноцитах; и (с) дифференцировку моноцитов, экспрессирующих один или более генов, выбранных из CD40L, CXCL13 и CD93, в незрелые дендритные клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления

моноциты являются CD14⁺ моноцитами. В некоторых вариантах осуществления способ включает: дифференцировку моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и/или CD93, в незрелые дендритные клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления моноциты являются CD14⁺ моноцитами. В некоторых вариантах осуществления клетка является CD34⁺ клеткой, которая трансдуцирована и дифференцирована, или размножена до моноцита и затем подвергнута созреванию, как предусмотрено в настоящем изобретении. В настоящем изобретении также описаны различные комбинации гетерологично экспрессируемых белков.

[0182] В некоторых вариантах осуществления моноциты получают из различных источников, таких как лейкофез мононуклеарных клеток периферической крови пациента с последующей элютриацией выделенной периферической крови с получением выделенных моноцитов. Выделенные моноциты могут быть подвергнуты генетическим манипуляциям для экспрессии любого одного или комбинации гетерологичных белков CD40L, CXCL13 и CD93 с помощью методик, раскрытых в настоящем изобретении, таких как липосомная трансфекция, химическая трансфекция, рекомбинация трансгенной ДНК, вирусная инфекция, вставка транспозона, вставка прыгающего гена, микроинъекция, электропорация, введение с помощью генной пушки и их комбинация. В некоторых вариантах осуществления может использоваться рекомбинантный аденовирусный вектор, рекомбинантный аденоассоциированный вектор, рекомбинантный ретровирусный вектор, рекомбинантный лентивирусный вектор или их комбинация. Такие методы, как доставка системы CRISPR/Cas, TALEN и цинкпальцевых нуклеаз, также могут использоваться для суперэкспрессии любого одного или комбинации гетерологичных белков CD40L, CXCL13 и CD93.

[0183] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные моноциты, экспрессирующие CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, выращивают в присутствии IL-3, вызывая пролиферацию моноцитов, с получения размноженной популяции моноцитов. Размноженную популяцию моноцитов подвергают дифференцировке в незрелые дендритные клетки, например, при культивировании размноженной популяции клеток с ГМ-КСФ и IL-4 (с получением исходных ДК или ДК типа 1) и, необязательно, ФНО- α , IL-1 β , IL-6, IFN- α , IFN- γ и PGE2.

[0184] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные аллогенные незрелые дендритные клетки могут активировать или стимулировать антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген может быть опухолевым антигеном или вирусным антигеном. В некоторых вариантах осуществления антиген может быть лизатом раковых клеток, при этом лизат раковых клеток может быть аллогенным или аутологичным по отношению к незрелой дендритной клетке. В некоторых вариантах осуществления лизат раковых клеток может представлять собой лизат раковых клеток меланомы, такой как лизат клеток DDM-1.7, лизат клеток DDM-1.13, или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления клетки не активируют и не стимулируют антигеном.

[0185] В некоторых вариантах осуществления активированные незрелые ДК, раскрытые в настоящем изобретении, могут присутствовать в композиции, включающей физиологически приемлемые носители, эксципиенты, адъюванты или разбавители. Примером подходящих разбавителей являются нейтральный буферный солевой раствор или солевой раствор, смешанный с сывороточным альбумином. В некоторых вариантах осуществления активированные незрелые ДК могут замораживать перед введением субъекту. Перед введением субъекту клетки могут размораживать.

[0186] Также в настоящем изобретении раскрыты способы лечения рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака у субъекта включает введение субъекту композиции, включающей рекомбинантную дендритную клетку, где дендритная клетка гетерологично экспрессирует один или более белков, выбранных из CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93. Как описано в настоящем изобретении, клетки могут быть аллогенными по отношению к субъекту. Клетки в некоторых вариантах осуществления могут быть аутологичными по отношению к субъекту.

[0187] В некоторых вариантах осуществления способ индукции иммунного ответа у субъекта, страдающего раком, включает введение субъекту композиции, содержащей дендритную клетку, где дендритная клетка гетерологично экспрессирует один или более белков, выбранных из CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0188] В некоторых вариантах осуществления способ введения противораковой вакцины субъекту, страдающему раком, включает введение субъекту композиции, содержащей дендритную клетку, где дендритная клетка гетерологично экспрессирует один или более белков, выбранных из CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93. В вариантах осуществления изобретения ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0189] В некоторых вариантах осуществления вводимые дендритные клетки (гетерологично экспрессирующие CD40L, CXCL13 и/или CD93) являются аллогенными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления вводимые дендритные клетки (гетерологично CD40L, CXCL13 и/или CD93) являются аутологичными по отношению к субъекту. В некоторых вариантах осуществления вводимые дендритные клетки представляют собой незрелые дендритные клетки, гетерологично экспрессирующие CD40L, CXCL13 и/или CD93. В некоторых вариантах осуществления

ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0190] В некоторых вариантах осуществления субъект страдает раком, выбранным из группы, состоящей из карциномы толстой кишки, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеогенной саркомы, хордомы, ангиосаркомы, эндотелиосаркомы, лимфангиосаркомы, лимфангиоэндотелиосаркомы, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, плоскоклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярной аденокарциномы, цистаденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточной карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, опухоли яичка, карциномы легкого, мелкоклеточной карциномы легкого, карциномы мочевого пузыря, эпителиальной карциномы, глиомы, астроцитомы, медуллобластомы, карциномы из клеток Меркеля, краниофарингомы, пинеаломы, гемангиобластомы, невриномы слухового нерва, олигодендроглиомы, менингиомы, меланомы, нейробластомы, ретинобластомы, острого лимфоцитарного лейкоза, острого миелоцитарного лейкоза, хронического лейкоза, истинной полицитемии, лимфомы, множественной миеломы, макроглобулинемии Вальденстрема, болезни тяжелых цепей и их комбинации.

[0191] В дополнительных вариантах осуществления рак является солидной опухолью, выбранной из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы и других сарком, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы, рака толстой кишки, лимфодного злокачественного новообразования, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака легкого, рак яичника, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, медуллярной карциномы щитовидной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, феохромоцитомы, папиллярной карциномы сальной железы, папиллярной карциномы, папиллярная аденокарциномы, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточной карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, опухоли яичка, семиномы, карциномы мочевого пузыря, меланомы и опухолей ЦНС (таких как глиома (например, глиома ствола мозга и смешанные глиомы), глиобластома (также известная как мультиформная глиобластома), астроцитома, лимфома ЦНС, герминома, медуллобластома, шваннома, краниофарингиома, эпендимома, пинеалома,

гемангиобластома, невринома слухового нерва, олигодендроглиома, менангиома, нейробластома, ретинобластома и метастазы в головной мозг.

[0192] В дополнительных вариантах осуществления способ также включает, в период с 4-14 дней после введения рекомбинантных дендритных клеток, введение пациенту ингибитора иммунной контрольной точки, включая любой один или комбинацию двух ингибиторов контрольных точек, включая ингибитор PD-1 или PD-L1 (B7-H1), таких как антитело к PD-1, включая ниволумаб (Ниволумаб, Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб/ламбролизумаб, также известный как МК-3475 (Китруда, Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune) или антитело к PD-L1, включая MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718 C (Merck), антагонист CTLA-4, такой как антитело к CTLA-4, включая антитело к CTLA4 Ервой™ (ипилимумаб, Bristol-Myers Squibb), тремелимумаб (Pfizer), Тицилимумаб (AstraZeneca) или AMGP-224 (Glaxo Smith Kline), или опухолеспецифичное антитело трастузумаб (Герцептин) для рака молочной железы, ритуксимаб (Ритуксан) для лимфомы или цетуксимаб (Эрбитукс).

[0193] В дополнительных вариантах осуществления лечение, введение или усиление иммунного ответа повторяют периодически в течение периодов времени, таких как описанные в Примерах 1-3, до тех пор, пока пациент демонстрирует улучшение или стабильное/непрогрессирующее заболевание.

[0194] В дополнительных вариантах осуществления лечение, введение или усиление иммунного ответа повторяют периодически в течение периодов времени от одного раза в 5 дней, одного раза в неделю, одного раза в 14 дней, одного раза в 21 день до одного раза в месяц, до одного раза в два месяца, до одного раза в 3 месяца, до одного раза в 4 месяца, до одного раза в 5 месяцев, до одного раза в 6 месяцев или один раз в 7 месяцев, или один раз в 8 месяцев, или один раз в 9 месяцев, или один раз в 10 месяцев, или один раз в 11 месяцев, или один раз в год, в качестве поддерживающей терапии, до тех пор, пока пациент демонстрирует улучшение или стабильное/непрогрессирующее заболевание.

[0195] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные дендритные клетки (гетерологично CD40L, CXCL13 и/или CD93), вводимые субъекту, не активируют или не стимулируют антигеном до введения. В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки могут вводить в композиции, включающей адьюванты, цитокины и интерлейкины, которые могут способствовать индукции иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0196] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает: (а) получение профиля экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии

субъекта;

(b) сравнение профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии с профилем экспрессии белков лизата клеток меланомы; и

(c) если по меньшей мере три маркера в профиле экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии совпадают с профилем экспрессии белков лизата клеток меланомы, то совместное культивирование дендритной клетки, суперэкспрессирующей CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, с лизатом клеток меланомы для активации дендритной клетки, и введение субъекту композиции, включающей активированную дендритную клетку; и

(d) если по меньшей мере три маркера в профиле экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии не совпадают с профилем экспрессии белков лизата клеток меланомы, то совместное культивирование дендритной клетки, суперэкспрессирующей CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, с образцом опухоли или биопсии для активации дендритной клетки, и введение субъекту композиции, включающей активированную дендритную клетку.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем изобретении, дополнительно включают скрининг профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии субъекта с целью перекрестной проверки совпадения с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли до введения; и введение активированной лизатом аллогенной опухоли дендритной клеткам или композиции активированной дендритной клетки, если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии перекрестно совпадают с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли. В рамках изобретения термин "перекрестная проверка совпадения" относится к сравнению профиля экспрессии белков в одном образце с другим образцом, таким как лизат опухоли, в сравнении с образцом биопсии или резецированной опухоли. Если белковый фрагмент обнаруживают и в лизате, и в образце, то говорят, что они совпадают.

[0197] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа, ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CXCL13. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L, CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CD40L и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК гетерологично экспрессируют CXCL13 и CD93. В некоторых вариантах осуществления ДК не экспрессируют гетерологично CD93.

[0198] В некоторых вариантах осуществления профиль экспрессии белков измеряют или сравнивают с помощью способов, хорошо известных в данной области, таких как белковые чипы, протеомика, масс-спектрометрия (МАЛДИ-МС) и т.п. В некоторых вариантах осуществления вместо профиля экспрессии белков для сравнения может использоваться профиль экспрессии генов. Профиль экспрессии генов может быть получен с помощью способов, хорошо известных в данной области, таких как генные чипы, микрочипы, ОТ-ПЦР и т.п.

[0199] В некоторых вариантах осуществления маркерами, которые сравнивают в профиле экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии и в профиле экспрессии белков лизата клеток меланомы, являются MAGE-антигены. См., например, публикации Scanlan, Matthew J. et al., *Immunological Revs.* 2002, 188:22-32 and Weon JL, Potts PR. The MAGE protein family and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;37:1-8. doi:10.1016/j.ceb.2015.08.002, каждая из которых полностью включена посредством отсылки.

[0200] В некоторых вариантах осуществления лизат клеток меланомы получен из клеточной линии, выбранной из группы, состоящей из DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления лизат клеток меланомы является лизатом опухоли MCV или лизатом, который соответствует некоторой части профиля экспрессии лизата опухоли MCV.

[0201] В некоторых вариантах осуществления введение производят путем внутриопухолевой, перитуморальной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной, внутрибрюшинной инъекции. Композиции вводят для стимуляции иммунного ответа и могут использовать путем болюсной инъекции, непрерывной инфузии, замедленного высвобождения из имплантатов или другим подходящим методом.

[0202] Исключительно в целях иллюстрации, способ можно осуществлять на практике путем получения и сохранения образцов крови субъекта перед инфузией для последующего анализа и сравнения. Как правило, пациенту весом 70 кг внутривенно или внутрибрюшинно вводят по меньшей мере приблизительно от 10^4 до 10^6 и обычно от 1×10^8 до 1×10^{10} клеток в течение примерно 60-120 минут.

[0203] В некоторых аспектах любой из способов лечения, описанных в настоящем изобретении, может дополнительно включать введение пациенту одной или более дополнительных противораковых терапий. Могут использоваться различные классы противоопухолевых средств. Неограничивающие примеры включают: лучевую терапию, алкилирующие средства (например, цисплатин, карбоплатин или оксалиплатин), антиметаболиты (например, азатиоприн или меркаптопурин), антрациклины, растительные алкалоиды (включающие, например, алкалоиды барвинка (такие как винкристин, винбластин, винорелбин или виндезин) и таксаны (такие как паклитаксел, таксол или доцетаксел)), ингибиторы топоизомеразы (например, камптотецины, иринотекан, топотекан, амсакрин, этопозид, этопозида фосфат или тенипозид), подофиллотоксин (и его производные, такие как этопозид и тенипозид), антитела (например, моноклональные или поликлональные), ингибиторы тирозинкиназ (например, иматиниба мезилат (Гливек[®])), гормональные средства, растворимые рецепторы и другие противоопухолевые средства (например, дактиномицин, доксорубицин, эпирубицин, блеомицин, мехлоретамин, циклофосфамид, хлорамбуцил или ифосфамид).

[0204] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления клетки и композиции, предложенные в настоящем изобретении, могут использоваться в дополнение или вместе с другими средствами или терапиями, обладающими

противоопухолевыми свойствами (см. патент США 9,914,783, который полностью включен в настоящее описание посредством отсылки). При использовании в качестве дополнения рекомбинантные ДК и соответствующие композиции и другое средство(а) могут быть вместе включены в один комбинированный фармацевтический состав или могут быть включены в отдельные составы и введены отдельно, согласно одной скоординированной схеме применения, либо разным схемам применения. Средства, вводимые дополнительно к рекомбинантным ДК и соответствующим композициям или вместе с ними, обычно будут обладать дополнительными активностями по отношению к рекомбинантным ДК и соответствующим композициям, таким образом, что клетки и другие агенты не будут оказывать неблагоприятного воздействия друг на друга.

[0205] Средства, которые могут использоваться в дополнение к антителам против PD-1, включают, без ограничения перечисленными, алкилирующие средства, ингибиторы ангиогенеза, антитела, антиметаболиты, антимитотики, антипролиферативные средства, противовирусные средства, ингибиторы киназы Aurora, промоторы апоптоза (например, ингибиторы семейства Bcl-2), активаторы пути рецептора смерти, ингибиторы киназы Vcr-Abl, антитела ViTE (от англ. Vi-Specific T cell Engager - Биспецифичные активаторы Т-клеток), конъюгаты антител-лекарственных средств, модификаторы биологического ответа, ингибиторы тирозинкиназы Брутона (ВТК), ингибиторы циклин-зависимых киназ, ингибиторы клеточного цикла, ингибиторы циклооксигеназы-2, DVD, ингибиторы рецептора гомолога онкогена вируса лейкоза (ErbB2), ингибиторы фактора роста, ингибиторы белка теплового шока (HSP)-90, ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC), гормональную терапию, иммунологические средства, ингибиторы ингибиторов белков апоптоза (IAP), интеркалирующие антибиотики, ингибиторы киназ, ингибиторы кинезина, ингибиторы Jak2, ингибиторы мишени рапамицина у млекопитающих, микроРНК, ингибиторы митоген-активируемых киназ, регулируемых внеклеточными сигналами, поливалентные связывающие белки, нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), ингибиторы поли-АДФ (аденозиндифосфат)-рибоза-полимеразы (PARP), химиотерапевтические средства на основе платины, ингибиторы Polo-подобной киназы (Plk), ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K), ингибиторы протеасом, аналоги пуринов, аналоги пиримидинов, ингибиторы рецепторной тирозинкиназы, ретиноиды/дельтоиды растительные алкалоиды, малые ингибирующие рибонуклеиновые кислоты (миРНК), ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы убиквитинлигазы и т.п., а также комбинации одного или более из этих средств.

[0206] Антитела ViTE представляют собой биспецифичные антитела, которые направляют Т-клетки на атаку раковых клеток путем одновременного связывания двух клеток. Затем Т-клетка атакует раковую клетку-мишень. Примеры антител ViTE включают адекатумумаб (Micromet MT201), блинатумомаб (Micromet MT103) и т.п. Без ограничения теорией считается, что один из механизмов, по которому Т-клетки вызывают апоптоз раковой клетки-мишени, осуществляется путем экзоцитоза компонентов

цитолитических гранул, включающих перфорин и гранзим В.

[0207] миРНК представляют собой молекулы, содержащие эндогенные основания РНК или химически модифицированные нуклеотиды. Модификации не устраняют клеточную активность, а скорее передают увеличенную стабильность и/или повышенную клеточную активность. Примеры химических модификаций включают фосфоротиоатные группы, 2'-дезоксинуклеотид, 2'-ОСН₃-содержащие рибонуклеотиды, 2'-F-рибонуклеотиды, 2'-метоксиэтил-рибонуклеотиды, их комбинации и т.п. миРНК может иметь различную длину (например, 10-200 п.н.) и структуру (например, шпильки, одиночные/двойные цепи, петли, ники/пропуски, неспаренные нуклеотиды) и процессируется в клетках, вызывая сайленсинг активных генов. Двухцепочечная миРНК (дцРНК) может иметь одинаковое количество нуклеотидов в каждой цепи (тупые концы) или асимметричные концы (выступы). Выступ из 1-2 нуклеотидов может присутствовать на смысловой и/или антисмысловой цепи, а также присутствовать на 5'- и/или 3'-концах данной цепи.

[0208] Мультивалентные связывающие белки представляют собой связывающие белки, включающие два или более антигенсвязывающих сайта. Мультивалентные связывающие белки сконструированы так, что они содержат три или более антигенсвязывающих сайта и, как правило, не являются природными антителами. Термин "мультиспецифичный связывающий белок" означает связывающий белок, способный связывать две или более родственных или неродственных мишеней. Связывающие белки с двойным вариабельным доменом (DVD) представляют собой четырехвалентные или мультивалентные связывающие белки, включающие два или более антигенсвязывающих сайта. Такие DVD могут быть моноспецифичными (т.е. способными связывать один антиген) или мультиспецифичными (т.е. способными связывать два или более антигенов). Связывающие белки DVD, включающие два полипептида DVD тяжелой цепи и два полипептида DVD легкой цепи, называются DVD Ig. Каждая половина DVD Ig включает полипептид DVD тяжелой цепи, полипептид DVD легкой цепи и два антигенсвязывающих сайта. Каждый связывающий сайт включает вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, содержащие в общей сложности 6 CDR-областей, участвующих в связывании антигена на каждый антигенсвязывающий сайт.

[0209] Алкилирующие средства включают, без ограничения, алтретамин, AMD-473, AP-5280, апазиквон, бендамустин, бросталлицин, бусульфид, карбоксон, кармустин (BCNU), хлорамбуцил, КЛОРЕТАЗИН® (ларомустин, VNP 40101M), циклофосфамид, дакарбазин, эстрамустин, фотемустин, глуфосфамид, ифосфамид, KW-2170, ломустин (CCNU), мафосфамид, мелфалан, митобронитол, митолактол, нимустин, N-оксид азотистого иприта, ранимустин, темозоломид, тиотепу, ТРЕАНДА® (бендамустин), треосульфид и трофосфамид.

[0210] Ингибиторы ангиогенеза включают ингибиторы эндотелиально-специфической рецепторной тирозинкиназы (Tie-2), ингибиторы рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR), ингибиторы рецепторов фактора роста эндотелия

сосудов (VEGF), ингибиторы дельта-подобного лиганда 4 (DLL4), ингибиторы рецепторов инсулиноподобного фактора роста 2 (IGFR-2), ингибиторы матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), ингибиторы матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9), ингибиторы рецепторов тромбоцитарного фактора роста (PDGFR), аналоги тромбоспондина и ингибиторы рецепторной тирозинкиназы фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR) и т.п.

[0211] Конъюгаты антитела-лекарственного средства включают, без ограничения перечисленными, конъюгаты, которые направленно воздействуют на киназу с-Met (например, конъюгаты, описанные в патенте США 7,615,529), LRRC15, CD30 (например, Адцетрис® (брентуксимаб ведотин)), CS1 (например, конъюгаты, описанные в публикации США 20160122430), DLL3 (например, ровалпитузумаб тезирин (ROVA-T)), HER2 (например, Кадсила® (трастузумаб эмтанзин)), EGFR (например, конъюгаты, описанные в публикации США 20150337042) и рецептор пролактина (например, конъюгаты, описанные в публикации США 20140227294).

[0212] Антиметаболиты включают, без ограничения перечисленными, Алимту® (пеметрекседа динатриевую соль, LY231514, МТА), 5-азацитидин, Кселоду® (капецитабин), кармофур, Лейстат® (кладрибин), клофарабин, цитарабин, цитарабина оксфосфат, цитозин-арабинозид, децитабин, дефероксамин, доксифлуридин, эфлорнитин, EICAR (5-этинил-1-β-D-рибофуранозилимидазол-4-карбоксамид), эноцитабин, этинилцитидин, флударабин, 5-фтороурацил (5-ФУ) отдельно или в комбинации с лейковорином, Гемзар® (гемцитабин), гидроксимочевину, Алкеран® (мелфалан), меркаптопурин, 6-меркаптопурина рибозид, метотрексат, микофеноловую кислоту, неларабин, нолатрексед, оксфосфат, пелитрексол, пентостатин, ралтитрексед, рибавирин, триапин, триметрексат, S-1, тиазофуридин, тегафур, TS-1, видарабин и UFT.

[0213] Противовирусные средства включают, без ограничения перечисленными, ритонавир, ацикловир, цидофовир, ганцикловир, фоскарнет, зидовудин, рибавирин и гидроксихлорохин.

[0214] Ингибиторы киназы Aurora включают, без ограничения, АВТ-348, AZD-1152, MLN-8054, VX-680, специфичные ингибиторы киназы Aurora A, специфичные ингибиторы киназы Aurora B и пан-ингибиторы киназ Aurora.

[0215] Ингибиторы белка Bcl-2 включают, без ограничения перечисленными, АВТ-263 (навитоклакс), АТ-101 ((-)-госсипол), Генасенс® (G3139 или облимерсен (Bcl-2-направленный антисмысловый олигонуклеотид)), IPI-194, IPI-565, N-(4-(4-((4'-хлор(1,1'-бифенил)-2-yl)метил)пиперазин-1-ил)бензоил)-4-(((1R)-3-(диметиламино)-1-((фенилсульфанил)метил)пропил)амино)-3-нитробензол-сульфонамид), N-(4-(4-((2-(4-хлорофенил)-5,5-диметил-1-циклогекс-1-ен-1-ил)метил)пиперазин-1-ил)бензоил)-4-(((1R)-3-(морфолин-4-ил)-1-((фенилсульфанил)метил)пропил)амино)-3-((трифторметил)сульфонил)бензолсульфонамид, венетоклакс и GX-070 (обатоклакс).

[0216] Ингибиторы киназы Vcr-Abl включают, без ограничения перечисленными, Дасатиниб® (BMS-354825) и Гливек® (иматиниб).

[0217] Ингибиторы ВТК включают, без ограничения перечисленными, ибрутиниб и акалабрутиниб.

[0218] Ингибиторы CDK включают, без ограничения перечисленными, AZD-5438, BMI-1040, BMS-032, BMS-387, CVT-2584, флавопиридол, GPC-286199, MCS-5A, PD0332991, РНА-690509,, селициклиб (СУС-202, R-росковитин), абемациклиб, палбоциклиб и ZK-304709.

[0219] Ингибиторы ЦОГ-2 включают, без ограничения перечисленными, АВТ-963, Аркоксиа® (эторикоксиб), Бекстра® (валдекоксиб), BMS347070, Целебрекс® (целекоксиб), СОХ-189 (лумиракоксиб), СТ-3, Дермакс® (деракоксиб), JTE-522, 4-метил-2-(3,4-диметилфенил)-1-(4-сульфамойлфенил-1H-пиррол), МК-663 (эторикоксиб), NS-398, парекоксиб, RS-57067, SC-58125, SD-8381, SVT-2016, S-2474, T-614 и Виокс® (рофекоксиб).

[0220] Ингибиторы EGFR включают, без ограничения перечисленными, АВХ-EGF, иммунолипосомы против EGFR, EGF-вакцину, EMD-7200, Эрбитукс® (цетуксимаб), HR3, антитела IgA, Ирессу® (гефитиниб), Тарцеву® (эрлотиниб или OSI-774), Тагриссо® (осимертиниб), TP-38, слитый белок EGFR и Тайверб® (лапатиниб).

[0221] Ингибиторы рецептора ErbB2 включают, без ограничения перечисленными, CP-724-714, CI-1033 (канертиниб), Герцептин® (трастузумаб), Тайверб® (лапатиниб), Омнитарг® (2C4, пертузумаб), ТАК-165, GW-572016 (ионафарниб), GW-282974, ЕКВ-569, PI-166, dHER2 (HER2 вакцину), APC-8024 (HER-2 вакцину), биспецифичное антитело к HER/2neu, B7.her2IgG3, трифункциональные биспецифичные антитела AS HER2, mAb AR-209 и mAb 2B-1.

[0222] Ингибиторы гистондеацетилазы включают, без ограничения перечисленными, депсипептид, LAQ-824, MS-275, трапоксин, субероиланилид гидроксамовой кислоты (SANA), TSA и вальпроевую кислоту.

[0223] Ингибиторы HSP-90 включают, без ограничения перечисленными, 17-AAG-nab, 17-AAG, CNF-101, CNF-1010, CNF-2024, 17-DMAG, гелданамицин, IPI-504, КОС 953, Микограб® (человеческое рекомбинантное антитело к HSP-90), NCS-683664, PU24FC1, PU-3, радицикол, SNX-2112, STA-9090, и VER49009.

[0224] Ингибиторы белков апоптоза включают, без ограничения перечисленными, HGS1029, GDC-0145, GDC-0152, LCL-161 и LBW-242.

[0225] Активаторы пути рецептора смерти включают, без ограничения перечисленными, TRAIL, антитела или другие средства, которые направленно воздействуют на TRAIL или рецепторы смерти (например, DR4 и DR5), такие как апомаб, конатумумаб, ETR2-ST01, GDC0145 (лексатумумаб), HGS-1029, LBY-135, PRO-1762 и трастузумаб.

[0226] Ингибиторы кинезина включают, без ограничения перечисленными, ингибиторы Eg5, такие как AZD4877, ARRY-520; и ингибиторы CENPE, такие как GSK923295A.

[0227] Ингибиторы JAK-2 включают, без ограничения перечисленными, CEP-701

(лестауртиниб), XL019 и INCB018424.

[0228] Ингибиторы MEK включают, без ограничения перечисленными, ARRY-142886, ARRY-438162, PD-325901 и PD-98059.

[0229] ингибиторы mTOR включают, без ограничения перечисленными, AP-23573, CCI-779, эверолимус, RAD-001, рапамицин, темсиролимус, АТФ-конкурентные ингибиторы TORC1/TORC2, включая PI-103, PP242, PP30 и Торин 1.

[0230] Нестероидные противовоспалительные средства включают, без ограничения перечисленными, Амигесик® (салсалат), Долобид® (дифлунисал), Мотрин® (ибупрофен), Орудис® (кетопрофен), Релафен® (набуметон), Фелден® (пироксикам), ибупрофен крем, Алив® (напроксен) и Напросин® (напроксен), Вольтарен® (диклофенак), Индоцин® (индометацин), Клинорил® (сулиндак), Толектин® (толмектин), Лодин® (этодолак), Торadol® (кеторолак) и Дейпро® (оксапрозин).

[0231] Ингибиторы PDGFR включают, без ограничения перечисленными, C-451, CP-673 и CP-868596.

[0232] Платиносодержащие химиотерапевтические средства включают, без ограничения перечисленными, цисплатин, Элоксатин® (оксалиплатин), эптаплатин, лобаплатин, недаплатин, Параплатин® (карбоплатин), сатраплатин и пикоплатин.

[0233] Ингибиторы Polo-подобной киназы включают, без ограничения, BI-2536.

[0234] Ингибиторы фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) включают, без ограничения перечисленными, вортманнин, LY294002, XL-147, CAL-120, ONC-21, AEZS-127, ETP-45658, PX-866, GDC-0941, BGT226, BEZ235 и XL765.

[0235] Аналоги тромбоспондина включают, без ограничения перечисленными, АВТ-510, АВТ-567, АВТ-898 и TSP-1.

[0236] Ингибиторы VEGFR включают, без ограничения перечисленными, АВТ-869, АЕЕ-788, АнгиозимTM (рибозим, который ингибирует ангиогенез (Ribozyme Pharmaceuticals (Boulder, Colo.) и Chiron (Emeryville, Calif.)), акситиниб (AG-13736), AZD-2171, CP-547,632, Цирамза® (рамуцирумаб), IM-862, Макуген® (пегаптамиб), Нексавар® (сорафениб, BAY43-9006), пазопаниб (GW-786034), ваталаниб (РТК-787, ZK-222584), Сутент® (сунитиниб, SU-11248), Стиваргу® (регорафениб), ловушку VEGF и ЗактимуTM (вандетаниб, ZD-6474).

[0237] Антибиотики включают, без ограничения перечисленными, интеркалирующие антибиотики, акларубицин, актиномицин D, амрубицин, аннамицин, адриамицин, Бленоксан® (блеомицин), даунорубицин, Келикс® или Миоцет® (липосомальный доксорубицин), элсамитруцин, эпирубицин, гларубицин, Заведос® (идарубицин), митомицин C, неморубицин, неокарциностаин, пепломицин, пирарубицин, ребеккамицин, стимуламер, стрептозоцин, Валстар® (валрубицин) и зиностаин.

[0238] Ингибиторы топоизомеразы включают, без ограничения перечисленными, акларубицин, 9-аминокамптотецин, амонафид, амсакрин, бекатекарин, белотекан, BN-80915, Камптозар® (иринотекана гидрохлорид), камптотецин, Кардиоксан® (дексразоксин), дифломотекан, эдотекарин, Элленс® или Фарморубицин® (эпирубицин),

этопозид, эксатекан, 10-гидроксикамптотецин, гиматекан, луртотекан, митоксантрон, ОнивайдTM (липосомальный иринотекан), оратецин, пирарубицин, пиксантрон, рубитекан, собузоксан, SN-38, тафлупозид и топотекан.

[0239] Антитела включают, без ограничения перечисленными, Авастин® (бевацизумаб), CD40-специфичные антитела, chTNT-1/B, деносумаб, Эрбитукс® (цетуксимаб), HUMAX-CD4® (занолимумаб), IGF1R-специфичные антитела, линтузумаб, OX-40-специфичные антитела, Панорекс® (эддреколомаб), Ренкарекс® (WX G250), Ритуксан® (ритуксимаб), тицилимумаб, трастузумаб, пертузумаб, Вектибикс® (панитумумаб) и антитела к CD20 I и II типов.

[0240] Гормональные средства включают, без ограничения перечисленными, Аримидекс® (анастрозол), Аромазин® (эксеместан), арзоксифен, Касодекс® (бикалутамид), Цетротид® (цетрореликс), дегареликс, деслорелин, Дезопан® (трилостан), дексаметазон, Дрогенил® (флутамид), Эвиста® (ралоксифен), АфемаTM (фадрозол), Фарестон® (торемифен), Фазлодекс® (фулвестрант), Фемару® (летрозол), форместан, глюкокортикоиды, Гекторол® (доксеркальциферол), Ренагель® (севеламера карбонат), лазофоксифен, лейпролида ацетат, Мегейс® (мегестрол), Мифепрекс® (мифепристон), Ниландрон® (нилутамид), Нолвадекс® (тамоксифена цитрат), Пленаксис® (абареликс), преднизон, Пропецию® (финастерид), рилостан, Супрефакт® (бусерелин), Трелстар® (рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (ЛГРГ)), Вантас® (имплантат с гистрелином), Веторил® (трилостан или модростан) и Золадекс® (фосрелин, госерелин).

[0241] Дельтоиды и ретиноиды включают, без ограничения перечисленными, сеокальцитол (EB1089 или CB1093), лексакальцитол (KH1060), фенретинид, Панретин® (алитретинол), Атраген® (липосомальный третиноин), Таргретин® (бексаротен) и LGD-1550.

[0242] Ингибиторы PARP включают, без ограничения перечисленными, АВТ-888 (велипариб), КУ-59436, AZD-2281 (олапариб), AG-014699 (рукапариб), МК4827 (нирапариб), BMN-673 (талазопариб), инипариб, BSI-201, BSI-15, INO-1001 и ONO-2231.

[0243] Растительные алкалоиды включают, без ограничения перечисленными, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин.

[0244] Ингибиторы протеасом включают, без ограничения перечисленными, Велкейд® (бортезомиб), Кипролис® (карфилзомиб), MG132, NPI-0052 и PR-171.

[0245] Примеры иммунологических средств включают, без ограничения перечисленными, интерфероны, ингибиторы иммунных контрольных точек, костимулирующие средства и другие иммуностимулирующие средства. Интерфероны включают интерферон альфа, интерферон альфа-2а, интерферон альфа-2b, интерферон бета, интерферон гамма-1а, Актимьюн® (интерферон гамма-1b), интерферон гамма-n1, их комбинации и т.п. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела, которые направленно воздействуют на PD-L1 (например, дурвалумаб, атезолизумаб, авелумаб, MEDI4736, MSB0010718C и MPDL3280A) и CTLA4 (антиген цитотоксических лимфоцитов 4; например, ипилимумаб, тремелиумаб). Костимулирующие средства

включают, без ограничения перечисленными, антитела к CD3, CD40, CD40L, CD27, CD28, CSF1R, CD137 (например, урелумаб), B7H1, GITR, ICOS, CD80, CD86, OX40, OX40L, CD70, HLA-DR, LIGHT, LIGHT-R, TIM3, A2AR, NKG2A, KIR (например, лирилумаб), TGF-бета (например, фрезолимумаб) и их комбинации.

[0246] Другие средства включают Альфаферон® (IFN-альфа), ВАН-002 (окисленный глутатион), Беромун® (тазонермин), Бексар® (тозитумомаб), Кэмпас® (алемтузумаб), дакарбазин, денилейкин, эпартузумаб, Граноцит® (ленограстим), лентинан, лейкоцитарный интерферон альфа, имиквимод, вакцину против меланомы, митумомаб, молграмостим, Милотарг® (гемтузумаб озогамицин), Нейпоген® (филграстим), OncoVAC-CL, Оварекс® (ореговомаб), пемтумомаб (Y-muHMFG1), Провенж® (сипулейцел-Т), саргарамостим, сизофиран, тецелейкин, Терацис® (Бацилла Кальметта-Герена), убенимекс, Вирулизин® (иммунотерапевтическое средство, Lorus Pharmaceuticals), Z-100 (специфическое вещество Маруяма или SSM), WF-10 (тетрахлордекаоксид (TCDO)), Пролейкин® (алдеслейкин), Задаксин® (тималфазин), Зинбрита® (даклизумаб, полученный высокопродуктивным способом) и Зевалин® (⁹⁰Y-ибритумомаб тиуксетан).

[0247] Модификаторы биологического ответа представляют собой средства, которые модифицируют защитные механизмы живых организмов или биологические ответы, такие как выживание, рост или дифференцировку клеток ткани, направляя их таким образом, чтобы они проявляли противоопухолевую активность, и включают, без ограничения перечисленными, крестин, лентинан, сизофиран, пицибанил, PF-3512676 (CpG-8954) и убенимекс.

[0248] Аналоги пиримидинов включают, без ограничения перечисленными, цитарабин (ара С или арабинозид С), цитозин-арабинозид, доксифлуридин, Флудару® (флударабин), 5-ФУ (5-фтороурацил), флоксуридин, Гемзар® (гемцитабин), Томудекс® (ралтитрексид) и Троксатил™ (триацетилуридин троксацитабин).

[0249] Аналоги пуринов включают, без ограничения перечисленными, Ланвис® (тиогуанин) и Пури-Нетол® (меркаптопурин).

[0250] Антимитотические средства включают, без ограничения перечисленными, батабулин, эпотилон D (KOS-862), N-(2-((4-гидроксифенил)амино)пиридин-3-ил)-4-метоксибензолсульфонамид, иксабепилон (BMS-247550), Таксол® (паклитаксел), Таксотер® (доцетаксел), PNU100940 (109881), патупилон, XRP-9881 (ларотаксел), винфлунин и ZK-EPO (синтетический эпотилон).

[0251] Ингибиторы убиквитинлигазы включают, без ограничения перечисленными, ингибиторы MDM2, такие как нутлины, и ингибиторы NEDD8, такие как MLN4924.

[0252] Рекомбинантные ДК и соответствующие композиции также могут использоваться для повышения эффективности лучевой терапии. Примеры лучевой терапии включают наружную дистанционную лучевую терапию, внутреннюю лучевую терапию (т.е. брахитерапию) и системную лучевую терапию.

[0253] Рекомбинантные ДК и соответствующие композиции могут вводить в

дополнение или вместе с другими химиотерапевтическими средствами, такими как АбраксанTM (ABI-007), АВТ-100 (ингибитор фарнезилтрансферазы), Адвексин® (вакцина Ad5CMV-p53), Альтокор® или Мевакор® (ловастатин), Амплиген® (поли-І-поли С12U, синтетическая РНК), Аптозин® (эксисулинд), Аредиа® (памидроновая кислота), арглабин, L-аспарагиназа, атаместан (1-метил-3,17-дион-андроста-1,4-диен), Авейдж® (тазаротен), АVE-8062 (производное комбретастина) ВЕС2 (митумомаб), кахектин или кахексин (фактор некроза опухоли), канваксин (вакцина), СЕAVАС® (вакцина против рака), СЕLEUK® (целмолейкин), Цеплен® (гистамина дигидрохлорид), Церварикс® (вакцина против вируса папилломы человека), СНОР® (С: Цитоксан® (циклофосфамид); Н: Адриамицин® (гидроксидоксорибуцин); О: Винкристин (Онковин®); Р: преднизон), ЦипатTM (ципротерона ацетат), комбрестатин А4Р, DAB(389)EGF (каталитический и транслокационный домены дифтерийного токсина, слитые через His-Ala линкер с человеческим эпидермальным фактором роста) или TransMID-107RTM (дифтерийные токсины), дакарбазин, дактиномицин, 5,6-диметилксантенон-4-уксусная кислота (DMXAA), энилурацил, ЭвизонTM (скваламина лактат), Димерицин® (Т4N5 липосомный лосьон), дискодермолид, DX-8951f (экзатекана мезилат), энзастаурин, ЕРО906 (эпотилон В), Гардасил® (четырёхвалентная рекомбинантная вакцина против вируса папилломы человека (типов 6, 11, 16, 18)), Гастриммун®, Генасенс®, GMK (ганглиозид-конъюгированная вакцина), GVAX® (вакцина против рака предстательной железы), галофугинон, гистрелин, гидроксикарбамид, ибандроновая кислота, IGN-101, IL-13-PE38, IL-13-PE38QQR (цинтредекин бесудотокс), IL-13-экзотоксин Pseudomonas, интерферон-альфа, интерферон-гамма ЮнованTM или МепактTM (мифамуртид), лонафарниб, 5,10-метилентетрагидрофолат, милтефозин (гексадецилфосфохолин), Неовастат® (АЕ-941), Нейтрексин® (триметрексата глюкуронат), Нипент® (пентостатин), Онконаза® (фермент рибонуклеаза), ONCOPHAGE® (вакцина против меланомы), ONCOVAX® (IL-2 вакцина), ОратецинTM (рубитекан), Осидем® (клеточный препарат на основе антител), Оварекс® мАт (мышинное моноклональное антитело), паклитаксел, ПандимексTM (агликон сапонины из женьшеня, включающие 20(S)протопанаксадиол (aPPD) и 20(S)протопанаксатриол (aPPT)), панитумумаб, PАНVАС®-VF (проходящая исследования вакцина против рака), пэгаспаргаза, ПЭГ Интерферон А, феноксодиол, прокарбазин, ребимастан, Ремоваб® (катумаксамаб), Ревлимид® (леналидомид), RSR13 (эфапроксирал), Соматулин® LA (ланреотид), Сориатан® (ацитретин), стауроспорин (Streptomyces staurosporus), талабостат (PT100), Таргретин® (бексаротен), Таксопрексин® (DNA-паклитаксел), Телцита® (канфосфамид, TLK286), темилифен, Темодар® (темозоломид), тесмилифен, талидомид, Тератоп® (STn-KLN), тимитак (2-амино-3,4-дигидро-6-метил-4-оксо-5-(4-пиридилтио)хиназолина дигидрохлорид), TNFERADETM (аденовектор: ДНК носитель, содержащий ген фактора некроза опухоли-альфа), Траклир® или Завеска® (бозентан), третиноин (Retin-A), тетрандрин, Трисенокс® (триоксид мышьяка), Вирулизин®, украин (производное алкалоидов чистотела большого), витаксин (антитело к альфа-ν βета-3), ХСУTRIN® (мотексафин гадолиний), КсинлейTM (атрасентан), КсиотаксTM (паклитаксел

полиглумекс), Йонделис® (трабектедин), ZD-6126, Зинекард® (дексразоксан), Зомета® (золендроновая кислота) и зорубицин, а также комбинации любого из этих средств.

[0254] НАБОРЫ

[0255] Кроме того, некоторые компоненты или варианты таких композиций рекомбинантных дендритных клеток могут быть представлены в наборе. Например, любая из композиций рекомбинантных дендритных клеток, а также композиции лизатов аутологичных или других опухолевых клеток могут быть предоставлены в замороженном виде и упакованы в наборе, отдельно или вместе с отдельными контейнерами любого из других средств из этапов прекондиционирования или посткондиционирования и необязательными инструкциями по применению.

[0256] Некоторые варианты осуществления также направлены на любую из вышеуказанных клеточных композиций в наборе. В некоторых вариантах осуществления набор может включать ампулы, одноразовые шприцы, капсулы, флаконы, пробирки и т.п. В некоторых вариантах осуществления набор может включать контейнер с одной дозой или контейнеры с множеством доз, содержащие состав для наружного применения согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления каждый контейнер с дозой может содержать одну или больше стандартных доз. В некоторых вариантах осуществления набор может включать аппликатор. В некоторых вариантах осуществления наборы включают все компоненты, требуемые для осуществления этапов кондиционирования/лечения. В некоторых вариантах осуществления клеточные композиции могут содержать консерванты или не содержать консервантов (например, в одноразовом контейнере). В некоторых вариантах осуществления композиции рекомбинантных дендритных клеток, экспрессирующих один или более из CD40L, CXCL13 или CD93, могут быть получены и заморожены в незрелом состоянии, подходящем для отправки в больницу или лечебный центр. В некоторых вариантах осуществления антигены для нагрузки, аутологичные или являющиеся, например, лизатом клеток меланомы, полученными из линии клеток, такой как DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинация, могут быть получены и заморожены отдельно от композиций рекомбинантных дендритных клеток при использовании стандартных методов, при этом композиции могут быть отправлены в больницу или лечебный центр для дальнейшей обработки и введения пациенту. В других вариантах осуществления композиции рекомбинантных дендритных клеток, экспрессирующих любой один или более из CD40L, CXCL13 или CD93, могут быть приготовлены и смешаны с желаемым аутологичным лизатом или, например, лизатом клеток меланомы, полученным из линии клеток, такой как DDM-1.7, DDM-1.13, для облегчения нагрузки рекомбинантных дендритных клеток опухолевыми антигенами, после чего эту смесь замораживают, чтобы эти композиции можно было отправить в больницу или лечебный центр для дальнейшей обработки и введения пациенту.

[0257] Кроме того, ожидается, что у некоторых пациентов любые из способов или схем лечения будут периодически повторяться для усиления ответа иммунной системы на

опухоли или инфекционный агент/агенты. Такое периодическое лечение может варьировать от одного раза в неделю, месяц до одного раза в два месяца, до одного раза в 3 месяца, до одного раза в 4 месяца, до одного раза в 5 месяцев, до одного раза в 6 месяцев или один раз в 7 месяцев, или один раз в 8 месяцев, или один раз в 9 месяцев, или один раз в 10 месяцев, или в 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающего лечения настолько долго, насколько это необходимо пациенту.

Схема лечения

[0258] В некоторых вариантах осуществления аллоДК трансдуцируют CD40L и CXCL13 для максимального привлечения Т-клеток и В-клеток пациентов и генерации каскада противоопухолевого клеточного и гуморального иммунного ответа.

[0259] В других необязательных вариантах осуществления трансдукция CD40L+и CXCL13+ аллоДК CD93 дополнительно способствует перекрестному обмену между аллогенными ДК и ДК реципиента с формированием у реципиента стабильной и длительной противоопухолевой иммуногенности.

[0260] У пациентов, опухоли которых можно подвергнуть биопсии или резекции, исследуют профиль экспрессии белков резецированных образцов опухоли и образцов биопсии. Если профиль экспрессии указывает на присутствие по меньшей мере 3 фрагментов, совпадающих с GMP-MCV, то рекомбинантные нзДК нагружают GMP-MCV (аллогенный или "доступный в продаже" опухолевый лизат) перед созреванием ДК *in vitro*.

[0261] В случае пациентов, образцы которых не содержат каких-либо общих фрагментов опухоли с аллогенными/доступными в продаже лизатами, получают лизат аутологичной опухоли и предоставляют опухолевый лизат незрелым рекомбинантным аллоДК, чтобы лизат аутологичной опухоли был процессирован и презентируван рекомбинантными незрелыми аллоДК.

[0262] Для любого не подлежащего резекции и биопсии пациента композицию рекомбинантных CD40L+ CXCL13+ аллоДК клеток (или, необязательно, дополнительно включающих CD93+) будут вводить пациенту без нагрузки антигеном в качестве иммунного адьюванта. С применением такого подхода с CD40L+ CXCL13+ (необязательно) CD93 аллоДК у пациентов с поздними стадиями рака можно вызвать ***новый противоопухолевый клеточный и гуморальный иммунный ответ*** на неоантигены опухоли и усилить существующий иммунный ответ с помощью быстрой, эффективной и недорогостоящей терапии.

[0263] **Краткое описание таких вариантов описано ниже:**

[0264] Вариант 1: Профиль экспрессии белков резецированных образцов опухоли и образцов биопсии исследуют на перекрестное совпадение с профилем экспрессия опухолевого лизата MelCancerVac (MCV). Если профиль экспрессии указывает на присутствие по меньшей мере 3 таких же фрагментов, совпадающих с лизатом опухоли GMP-MCV, коммерческим продуктом, у пациента может использоваться вакцина на основе стимулированных лизатом опухоли MCV модифицированных/активированных

рекомбинантных аллогенных ДК (аллоДК/MCV опухолевый лизат).

[0265] Вариант 2: Если профиль экспрессии белков не совпадает с профилем лизата MCV, незрелым рекомбинантным аллоДК предоставляют лизат аутологичной опухоли для созревания после стимуляции *in vitro*.

[0266] Вариант 3: Для не подлежащих резекции и биопсии пациентов, CD40L+CXCL13 (и, необязательно, CD93) рекомбинантные аллоДК можно вводить в качестве иммунного адьюванта без стимуляции антигеном или активации.

[0267] Возможный вариант получения рекомбинантных ДК клеток состоит в применении рекомбинантного аденовирусного вектора/CRISPR Cas9 для трансдукции CD40L и CXCL13 в очищенные человеческие CD14+ моноциты, а не лентивирусного вектора или ретровирусного вектора. Эффективность трансдукции и функциональность трансдуцированных моноцитов, включая миграцию, дифференцировку и секрецию цитокинов, будут оценивать, чтобы гарантировать, что рекомбинантные/трансгенные моноциты могут дифференцироваться в функциональные и иммуногенные ДК.

[0268] Использование аденовирусов (AdV) выгодно по ряду причин, включая высокую эффективность трансдукции для многих типов клеток, включая клетки гемопоэтического происхождения, независимо от их митотического статуса. Еще одно преимущество заключается в том, что AdV с дефектной репликацией клинически продемонстрировал профиль безопасности. Кроме того, AdV обеспечивает высокий уровень экспрессии трансгена, и AdV-трансдуцированные ДК могут эффективно презентировать антигенные белки. Рекомбинантные аденовирусные векторы могут успешно трансфицировать незрелые ДК с эффективностью 95% (см. Lei Zhong, et al. *Eur. J. Immunol.* 1999.29:964-972). Однако также ожидается, что могут использоваться дополнительные вирусные векторные системы, включая лентивирусные векторы (см. коммерческие источники, такие как Vectalys (Toulouse France), и подобные способы в патенте США 10,272,111).

[0269] Лиганд хемокина (с C-X-C мотивом) 13 (CXCL13), также известный как хемоаттрактант В-лимфоцитов (BLC) или привлекающий В-клетки хемокин 1 (BCA-1), представляет собой белковый лиганд, кодируемый у человека геном CXCL13. Рецептором CXCL13 является CXCR5. Экспрессия хемокинов инициирует положительный цикл рекрутинга и стимуляции лимфоцитов. Суперэкспрессия CXCL13 в эпителиоцитах кишечника вызвала заметное увеличение количества В-клеток в базальной мембране и увеличение размера и количества лимфоидных фолликулов в тонкой кишке (см., Marchesiet al. *Mucosal Immunology.* 2009.2(6):486-494).

[0270] Эти результаты указывают, что суперэкспрессия CXCL13 в кишечнике при воспалительных заболеваниях способствует мобилизации В-клеток и LT_i и NK-клеток с иммуномодулирующими и репаративными функциями.

[0271] Лиганд CD40 (CD40L), также называемый CD154, представляет собой белок, который является членом суперсемейства молекул ФНО. Он связывается с CD40 на антигенпрезентирующих клетках (АПК), что приводит к различным эффектам в

зависимости от типа клетки-мишени. Всего CD40L имеет три партнера по связыванию: CD40, $\alpha 5\beta 1$ интегрин и $\alpha 1\beta 3$. CD154 действует как костимулирующая молекула и особенно важен на субпопуляции Т-клеток, называемых фолликулярными Т-хелперными клетками (TFH-клетками). На TFH-клетках CD40L способствует созреванию В-клеток и действует путем захвата CD40 на поверхности В-клеток и, таким образом, способствует межклеточной коммуникации. Стабильная экспрессия CD40L позволяет ДК продуцировать IL-12, преодолевая иммуносупрессию и вызывая дифференцировку Т-клеток памяти.

[0272] CD93 представляет собой O-сиалогликопротеин массой приблизительно 120 кДа, который в гемопоетической системе селективно экспрессируется на клетках миелоидной линии дифференцировки. Его первичная структура и функция до недавнего времени не были известны. Клонирование путем ретровирусной экспрессии использовали для выделения кДНК CD93. Секвенирование показало, что CD93 идентичен белку на фагоцитах человека, называемому рецептором C1q (C1qR_p). C1qR_p, как было ранее показано, опосредовал усиление фагоцитоза в моноцитах, и предположили, что он является рецептором для C1q и двух других структурно родственных молекул. При изучении трансдуктантов CD93 и контрольных клеток было обнаружено, что клетки, экспрессирующие CD93, обладали улучшенной возможностью связывать C1q. Кроме того, было показано, что незрелые дендритные клетки (ДК) экспрессируют CD93/C1qR_p, а зрелые ДК, которые, как известно, имеют пониженную способность к захвату антигенов и теряют способность к фагоцитозу, демонстрируют слабую или отрицательную экспрессию CD93/C1qR_p.

Клетки, которые использовали в качестве источника клеток для трансдукции гетерологичными белками, как предложено в настоящем изобретении, могут быть получены у любого донора. В некоторых вариантах осуществления донора обследуют с целью определения, что клетки, выделенные от донора, будут считаться аллогенными по отношению к субъекту, которому их вводят. В некоторых вариантах осуществления критерии скрининга доноров могут включать демографические данные доноров, включающие: возраст донора, пол донора, этническую принадлежность донора, ABO/Rh донора; BMI донора (вес и рост), HLA-типирование доноров с высоким разрешением.

[0273] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, донорские образцы могут быть подвергнуты полному исследованию показателей для переливания крови (FDA), на материале лейкофереза (или независимо от того, какой исходный материал используется), включающему: тест на ЦМВ; серологическое исследование на сифилис и скрининг антител; и панель инфекционных заболеваний, включающую один или более следующих тестов: антитело к кор-антигену гепатита В (антитело к HBs EIA); поверхностный антиген гепатита В (HBsAg EIA); антитело к вирусу гепатита С (антитело к HCV EIA); Ат к Вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ1/2 плюс группа O); антитело к Т-лимфотропному вирусу человека (HTLV-I/II); исследование нуклеиновой кислоты ВИЧ-1/HGV/HBV; исследование нуклеиновой кислоты WNV; антитело к *Trypanosoma cruzi*; и

вирусу Зика. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, донорские клетки или клетки, которые вводят пациенту, получены от донора, который не имеет ЦМВ, сифилис, гепатит А, гепатит В, гепатит С, ВИЧ, HTLV-I/II, вирус лихорадки Западного Нила (WNV), *Trypanosoma cruzi* и/или вирус Зика.

[0274] Образцы могут оценивать на процент и количество моноцитов с помощью гематологического анализатора и проточной цитометрии.

[0275] Образцы могут собирать путем афереза или забора цельной крови и подвергать стандартному контролю. В некоторых случаях забор производят с помощью системы лейкофереза Optia. Образцы будут исследовать на жизнеспособность и % CD14+ и производить подсчет CD14+ моноцитов.

[0276] Другим возможным вариантом является проведение негативного выделения моноцитов с помощью системы CliniMACS в соответствии со стандартными процедурами.

Контроль чистоты после выделения и подсчет клеток

[0277] В некоторых вариантах осуществления трансфекцию очищенного моноцита производят аденовирусным вектором, включающим CD40L и CXCL13 (и в некоторых вариантах осуществления CD40L, CXCL13 и CD93).

[0278] В некоторых вариантах осуществления трансфекцию очищенного моноцита производят лентивирусным вектором, включающим CD40L и CXCL13 (и в некоторых вариантах осуществления CD40L, CXCL13 и CD93).

[0279] После контакта с вирусным вектором могут быть отобраны положительно трансфицированные моноциты. Например, могут быть отобраны клетки с одним или более следующими положительными или отрицательными маркерами: негативная линия (CD3-, CD56-, CD19-, CD66b-), CD45+, CD14+, CD40L+, CXCL13+, CD1c+, CD11b+, CD11c+, HLA-DR+, CD86+, CD80low, CD83-, CD16Low, CD33 +, CD163-, CD206+ или CD209.

[0280] В некоторых случаях эффективность трансдукции клеток будут оценивать перед положительной сортировкой, чтобы можно было вычислить выход. Эффективность трансдукции нужна/полезна для определения ожидаемого выхода CD40L+CXCL13+ или CD40L+CXCL13+CD93+ клеток моноцитов.

[0281] Согласно изобретению, клетки могут быть моноцитами, которые могут быть дифференцированы в незрелые дендритные клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления клетки (трансдуцированные или нетрансдуцированные) центрифугируют для выделения клеток. Клетки можно, например, центрифугировать при 400×g в течение 10 минут при комнатной температуре (КТ) с небольшим перерывом. Центрифугированные клетки могут быть отделены от своего супернатанта. Центрифугированные клетки могут быть ресуспендированы с X-VIVO 15, рекомбинантным человеческим ГМ-КСФ, например, (1000 единиц/мл), и IL-4 (1000 единиц/мл) во флаконе для культивирования клеток, и клеткам можно позволить дифференцировать моноциты в термостате в течение по меньшей мере или приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. В некоторых

вариантах осуществления клеткам позволяют дифференцироваться в течение от приблизительно 4 до приблизительно 8 дней.

[0282] В некоторых вариантах осуществления дифференцированные клетки затем можно собирать из среды для культивирования клеток и центрифугировать. Например, в некоторых вариантах осуществления среду для культивирования клеток собирают из флаконов для культивирования в центрифужные пробирки. PBS может быть помещен во флаконы для культур клеток, чтобы покрывать поверхность флаконов. Флакон для культур клеток можно инкубировать с PBS при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂ в течение приблизительно 30 минут. В некоторых вариантах осуществления содержимое флаконов собирают в центрифужные пробирки, постукивая по флаконам после инкубирования. Флаконы можно промыть и собрать в центрифужные пробирки. В некоторых вариантах осуществления собранные клетки можно центрифугировать, например, при 400×g в течение 10 минут при КТ с небольшим перерывом. После центрифугирования клетки отделяют от супернатанта и выделяют клетки. Клетки могут быть ресуспендированы и исследованы на жизнеспособность.

[0283] В некоторых вариантах осуществления образцы исследуют на количество клеток и проводят идентификацию соответствующих биомаркеров с помощью проточной цитометрии. Они могут быть исследованы или могут быть отобраны по одному или более следующим положительным или отрицательным маркерам: негативная линия (CD3-, CD56-, CD19-, CD66b-), CD45+, CD14+, CD40L+, CXCL13+, CD1c+, CD11b+, CD11c+, HLA-DR+, CD86+, CD80low, CD83-, CD16Low, CD33+, CD163-, CD206+ или CD209.

[0284] Согласно изобретению, моноциты могут быть трансдуцированы вирусным вектором, таким как лентивирус или аденовирус. Может использоваться любой протокол вирусной трансдукции. Например, клетки можно культивировать в смешанной среде. В некоторых вариантах осуществления среда включает 100 нг/мл mFlt3L/mTPO/mSCF и 30 нг/мл mIL-3. Например, клетки можно культивировать в этой среде, инкубировать при 37°C и 5% CO₂ в течение 24 часов или до активации. После активации клетки можно предварительно обрабатывать PGE₂. Затем клетки можно трансдуцировать соответствующим вектором. В некоторых вариантах осуществления вирус добавляют при MOI (множественности заражения), равной 10, 100 или 1000. После трансдукции клетки могут быть выделены, например, при использовании сфер или продуктов очистки, которые связываются с одним или более гетерологичными белками, кодируемыми вектором. Например, клетки можно собирать после процесса трансдукции с использованием микросфер CD40L (Miltenyi) для очистки клеток, экспрессирующих CD40L.

[0285] В некоторых вариантах осуществления для дифференцировки трансдуцированных моноцитов, таких как CD34+ лентивирус+ трансдуцированные клетки, с получением CD14+ CD16+ моноцитов, очищенные CD34+ Lv+ клетки можно размножить в течение 3-10 дней путем культивирования 1×10⁵ CD34+ клеток/мл в среде для размножения в G-Rex 10M (среда X-VIVO 10; человеческая АВ сыворотка 10%; rhSCF

50 нг/мл (R&D Systems); TPO 15 нг/мл (R&D Systems); IL-3 30 нг/мл (R&D Systems); Flt-3L 30 нг/мл (R&D Systems). После размножения клеток (1-10 дней) клетки можно переместить в среду для дифференцировки в G-Rex 100M на 14 дней. Один неограничивающий пример среды для дифференцировки включает, без ограничения, IMDM с 20% человеческой сыворотки АВ; 25 нг/мл SCF (R&D Systems); 30 нг/мл М-КСФ (R&D Systems); 30 нг/мл IL-3 (R&D Systems); и 30 нг/мл Flt-3L (R&D Systems). Затем клетки можно инкубировать в смеси для дифференцировки в течение приблизительно или по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 дней. Неограничивающим примером смеси для дифференцировки является RPMI-1640; 3% человеческой АВ сыворотки; 900 МЕ/мл ГМ-КСФ; 1000 МЕ/мл IL-4; 400 МЕ/мл ФНО-альфа; и 0,2 нг/мл TGF бета 1. Смесь для дифференцировки может усиливать дифференцировку моноцитов в незрелые дендритные клетки.

[0286] В некоторых вариантах осуществления для дальнейшего ускорения созревания незрелых дендритных клеток клетки можно инкубировать в смеси для созревания. В некоторых вариантах осуществления смесь для созревания содержит антиген, опухолевый лизат или живую опухолевую клетку. Соответствующие примеры представлены в настоящем изобретении. Смесь для созревания может включать, например, 500 МЕ/мл ГМ-КСФ; 400 нг/мл IL-15; 100 нг/мл IFN-гамма; 2 нг/мл ФНО-альфа; и 2 мкг/мл PGE2. Количества являются примерными и не ограничены такими количествами. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиция для созревания (смесь) содержит ГМ-КСФ, IL-15, IFN-гамма, ФНО-альфа и/или PGE2. Клетки можно инкубировать в этих композициях для созревания в течение от приблизительно 12 до приблизительно 48 часов, от приблизительно 20 до приблизительно 40 часов, от приблизительно 30 до приблизительно 38 часов, приблизительно или по меньшей мере 12, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 или 48 часов. Смесь для созревания также может включать ФНО- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ и/или rIC.

[0287] Результаты эксперимента с использованием одного или более этих вариантов осуществления проиллюстрированы на **Фиг. 2А-Е**, репрезентативное фенотипирование и оценка чистоты с использованием выделенных на CliniMACS CD14+ моноцитов.

[0288] Было показано, что незрелые рекомбинантные ДК проявляют фагоцитозную способность, показанную на **Фиг. 4А-В**. Что касается результатов, показанных на **Фиг. 4А-В**, фагоцитоз флуоресцентно меченных частиц *Escherichia coli* (*E. coli*) полученными незрелыми ДК наблюдали с помощью проточной цитометрии. **Фиг. 4А** представляет собой отрицательный контроль; тогда как на **Фиг. 4В** показано, что 86,13% продукта фагоцитировали флуоресцентно меченые частицы *E. coli*. Используемые анализы могут представлять собой любой анализ фагоцитозной активности.

[0289] Кроме того, на **Фиг. 5А-Д** показано, что рекомбинантные ДК стимулировали пролиферацию аллогенных Т-клеток, как было показано при разведении сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). Что касается результатов,

показанных на **Фиг. 5A-D**, аллогенные Т-клетки метили CFSE и совместно культивировали с рекомбинантными аллоДК. Пролиферацию Т-клеток можно наблюдать при разведении CFSE. В левой колонке (Фиг. 5А и С) показана пролиферация в День 4, в правой колонке показана пролиферация в День 7 (Фиг. 5В и D). Эти результаты иллюстрируют, что рекомбинантные аллоДК стимулировали пролиферацию аллогенных Т-клеток.

[0290] Полезный аспект композиций и способов по изобретению включает возможность создания банка рекомбинантных ДК для получения коммерческой вакцины для применения в местной больнице для удобства лечения пациента. Такие рекомбинантные ДК можно затем использовать тремя различными способами: 1) их можно нагружать аутологичным опухолевым лизатом или (2) в других случаях их можно нагружать опухолевым лизатом MCV (Dandrit GMP, если ≥ 3 эпитопов опухоли пациента присутствует в пуле антигенов MCV) или другим коммерческим аллогенным опухолевым лизатом; или (3) в случае не подлежащих резекции опухолей могут не проводить нагрузку антигеном.

[0291] На следующем этапе получения вакцины на основе рекомбинантных ДК рекомбинантные аллоДК подвергают созреванию при использовании смеси рекомбинантных человеческих цитокинов, таких как описанные выше.

[0292] Затем клетки подвергают анализу фенотипа и функциональной оценке (как показано на Фиг. 4-5), а также оценке экспрессии соответствующих трансгенов (например, CD40L, CXCL13 и CD93). Наконец, рекомбинантные ДК замораживают или, более конкретно, подвергают криоконсервации, как правило, криоконсервации с контролируемой скоростью, а затем используют в клинических условиях после размораживания. Такие клетки служат основой для биологической вакцины/иммунного адъюванта на основе рекомбинантных ДК для лечения рака, опухолей и злокачественных новообразований. Схема процесса лечения, подготовки клеток и вакцинации представлена на Фиг. 9.

[0293] В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают, что может именоваться криоконсервацией. Клетки, например, могут замораживать с помощью CryoStor CS5 (среды для замораживания). Однако это - неограничивающий пример сред для замораживания, и могут использоваться другие среды для замораживания. Клетки могут первоначально охлаждать при 4°C. Затем клетки могут охлаждать до приблизительно -20°C. Клетки могут центрифугировать или ресуспендировать в дополнительных средах для замораживания и затем постепенно охлаждать до -90°C. Затем клетки могут храниться в жидком азоте. В некоторых вариантах осуществления клетки замораживают в криомешке.

[0294] Клетки могут размораживать путем размораживания в водяной бане при 37°C. В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают, не перемещая клетки в водяную баню, чтобы исключить движения в виде цифры 8 или колебания. Затем клетки могут подвергать контакту с плазмой и подогретыми средами для размораживания.

Затем клетки могут исследовать на жизнеспособность, прежде чем вводить субъекту. Примеры маркеров представлены в настоящем изобретении и выше.

[0295] В некоторых вариантах осуществления дендритные клетки подвергают созреванию с использованием смеси цитокинов и/или нагружают ДК аутологичным опухолевым лизатом/MCV. Например, жизнеспособные незрелые ДК можно культивировать с опухолевым лизатом или MCV с ДК клетками. Это может быть выполнено в присутствии смеси для созревания, такой как описанной выше, или, например, композиции, включающей ФНО- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ и rIC. Клетки могут инкубировать с такой композицией в течение от приблизительно 12 до приблизительно 36 часов, например, или приблизительно, или по меньшей мере 20, 22, 24, 26, 28 или 30 часов. Зрелые клетки затем могут собирать и исследовать. Зрелые клетки могут также замораживать с использованием сред для замораживания и процесса поэтапного замораживания, такого как описанный в настоящем изобретении.

[0296] Как описано в настоящем изобретении, клетки могут инкубировать или нагружать опухолевым лизатом. Опухолевый лизат может быть получен любым способом. Например, в некоторых вариантах осуществления предоставляют опухолевый материал (выделенный, полученный, резецированный и т.д.). Образец могут мгновенно замораживать в жидком азоте. В некоторых вариантах осуществления образец не содержит незлокачественную ткань. Это может означать, что образец был удален без какой-либо незлокачественной ткани или что образец был дополнительно обработан для удаления такой незлокачественной ткани. Затем образец могут размораживать и быстро замораживать 1-5 раз, способствуя лизису клеток. Лизат могут центрифугировать и фильтровать с получением опухолевого лизата. Лизат могут хранить в замороженном виде, например, в морозильной камере при -80°C .

[0297] Далее варианты осуществления описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры представлены исключительно в целях иллюстрации, при этом варианты осуществления никоим образом не следует рассматривать как ограниченные этими примерами, а следует рассматривать как охватывающие все возможные вариации, которые становятся очевидными благодаря изложенному в настоящем изобретении. Специалисты в данной области легко сумеют распознать множество второстепенных параметров, которые могут быть изменены или модифицированы для получения по существу аналогичных результатов.

[0298] Пример 1

[0299] Неоперабельный пациент с метастатическим раком толстой и прямой кишки

[0300] У пациента мужского пола в возрасте 29 лет был диагностирован рак толстой и прямой кишки с первичной колоректальной опухолью размером 6 см, удаленной после постановки диагноза. Пациент от вспомогательной химиотерапии отказался. Через 18 месяцев после первой операции у пациента возник рецидив в первичном опухолевом очаге с множественными мезентериальными метастазами и

метастазами в печень. Пациенту провели экстренную операцию с наложением колостомы в связи с рецидивом первичной опухоли (16 см), блокирующей колоректальный просвет. Трепан-биопсию отбирали из первичной опухоли пациента во время колостомии. Через три недели после операции пациент начал получать аллогенные ДК, стимулированные аутологичными опухолевыми клетками, презентующими CD40L, которые были подвергнуты созреванию с использованием смеси для созревания, как описано выше. Другого лечения пациент не получал. График введения вакцины включал введение 1×10^6 нагруженных CD40L+ алло-ДК клеток, вводимых подкожно раз в 15 дней. **Фигуры 6А-В** являются изображениями сканов КАТ/ПЭТ (КТ), показывающих значительное уменьшение опухолевой массы через 6 месяцев (12 инъекций) введения нагруженных CD40L+ алло-ДК клеток. Первичная опухоль уменьшилась с 12 см до 17,3 мм × 34,5 мм (Фиг. 6В) после 6 месяцев лечения вакциной на основе CD40L+ аллоДК, нагруженных аутологичными опухолевыми клетками. Эти клетки были трансдуцированы для экспрессии CD40L, и при этом ожидали, что аллоДК клетки, дополнительно трансдуцированные CXCL13 и, необязательно, CD93, будут дополнительно усиливать противоопухолевые эффекты (нагруженные аутологичной опухолью), как и аллоДК CD40L+ клетки.

[0301] Пример 2: Мужчина 69 лет с неоперабельным метастатическим раком толстой и прямой кишки

[0302] У пациента мужского пола в возрасте 68 лет диагностировали рак толстой и прямой кишки, первичную колоректальную опухоль размером пять сантиметров (5 см) удаляли после постановки диагноза. Пациент проходил лечение по схеме FOLFOX в течение 6 месяцев. При последующем наблюдении после лечения FOLFOX у пациента возник рецидив в первичном очаге опухоли с множественными печеночными и легочными метастазами. После наблюдения пациент начал лечение по схеме FOLFIRINOX. Через шесть месяцев лечения FOLFIRINOX пациента подвергли экстренной колостомии из-за рецидива первичной опухоли, вызвавшего обструкцию колоректального просвета. Пациент начал получать вакцину на основе стимулированных аутологичной опухолью аллоДК, презентующих CD40L, подвергнутых созреванию с использованием смеси для созревания, как описано в настоящем изобретении выше.

[0303] Во время введения вакцины пациент получал только капецитабин. График введения вакцины включал введение 2×10^6 клеток, вводимых подкожно раз в 15 дней. Изображения КТ/ПЭТ на **Фиг. 7А-Д** демонстрируют значимое уменьшение печеночных и легочных опухолевых масс через шесть месяцев (12 инъекций) лечения вакциной на основе аллоДК CD40L+, нагруженных аутологичными опухолевыми клетками. Эти клетки были трансдуцированы для экспрессии CD40L, и при этом ожидали, что аллоДК клетки, дополнительно трансдуцированные CXCL13 и, необязательно, CD93, будут дополнительно усиливать противоопухолевые эффекты (при нагрузке аутологичной опухолью), как и аллоДК CD40L+ клетки.

[0304] Пример 3: Женщина 45 лет с метастатическим инвазивным

протоковым раком молочной железы

[0305] У пациентки диагностировали HER-2-положительный, ER и PR-отрицательный рак, она проходила мастэктомию в 2008 году (T1cN2M0). Пациентка получала ТАС в течение 6 месяцев, и болезнь перешла в стадию ремиссии. В 2010 году ПЭТ подтвердила метастазирование. Пациентка получала гемцитабин, карбоплатин, трастузумаб, при этом болезнь прогрессировала. Затем пациентка получала бортезомиб и лапатиниб, и болезнь продолжала прогрессировать. Лечение третьей линии адотрастузумабом эмтанзином начали в 2013 году и продолжали до 2015 года. Прогрессирование в легких продолжалось.

[0306] Затем пациентка получала лечение пятой линии трастузумабом и винорелбином с августа 2015 года, которое остановили в апреле 2016 года из-за прогрессирования. Лечение шестой линии трастузумабом, бортезомибом и эрибулином начинали в апреле 2016 года и прекратили в июле 2016 года из-за прогрессирования. Лечение седьмой линии трастузумабом эмтанзином и палбоциклибом начинали в июле 2017 года и прекратили в январе 2018 года из-за прогрессирования. Лечение восьмой линии фулвестрантом, трастузумабом и палбоциклибом проводили с января до августа 2017 года и остановили из-за прогрессирования.

[0307] У пациентки диагностировали метастазы в головном мозге в октябре 2017 года при краниотомии в правой области, и в общей сложности 5 очагов в головном мозге были удалены с помощью стереотаксической радиохирургии. Пациентка в то время больше не получала лечение головного мозга. В феврале 2018 года пациентка начала прием трастузумаба, иксабепилона и капецитабина и прекратила лечение в апреле 2018 года из-за прогрессирования. В августе 2018 года пациентка проходила тотальное облучение головного мозга для поддержания физической формы, необходимой для поездок с целью получения иммунотерапевтического лечения. Пациентка получала адоптивную клеточную терапию в качестве начального лечения до проведения процедуры бронхоскопической биопсии опухоли в сентябре 2018 года.

[0308] В сентябре 2018 года пациентка начала получать стимулированные аутологичными опухолевыми клетками аллоДК, экспрессирующие CD40L и CXCL13, подвергнутые созреванию с использованием смеси для созревания, как описано в настоящем изобретении. Доза вакцинации составляла 10^6 клеток, вводимых подкожно (п/к). Схема введения вакцины была следующей: инъекции #1-#4 раз в 7 дней, #5-#8 раз в 10 дней, #9-#12 раз в 15 дней (всего 12 п/к инъекций за 130 дней). Изображения КТ и ПЭТ/КТ на **Фиг. 8А-Д** демонстрируют значимое уменьшение очагов в легких через месяц после лечения CD40L+CXCL13+ аллоДК клетками, стимулированными аутологичными опухолевыми клетками.

[0309] Эти клетки были трансдуцированы для экспрессии CD40L и CXCL13, и при этом ожидали, что аллоДК клетки, дополнительно трансдуцированные CD93, дополнительно усилят противоопухолевые эффекты (при нагрузке аутологичной опухолью) в сочетании с линиями CD40L+CXCL13+ аллоДК клеток, принимая во

внимание синергические результаты *in vitro*, как показано ниже на **Фиг. 10-12**.

Пример 4: Тестирование *in vitro*

[0310] Пролiferация Т-клеток (Фиг. 10)

[0311] Лизат опухоли, полученной от пациентки с раком молочной железы, использовали для получения генно-модифицированных зрелых ДК при использовании лентивируса, экспрессирующего CD40L+CXCL13+CD93 или CD40L+CXCL13, или только CD40L. Затем зрелые алло-ДК (2×10^4) совместно культивировали с CD3+ Т-клетками периферической крови (1×10^6) в среде TechMACS (Miltenyi) с добавкой 500 МЕ/мл IL-2 (R&D Systems) в тройной повторности. Персистенция алло-ДК измеряли с помощью проточной цитометрии (CD86 и CD1a) через 48 ч после посева. При каждом условии жизнеспособные алло-ДК через 48 ч совместного культивирования не обнаруживали.

[0312] Пролiferация НК-клеток (Фиг. 11)

[0313] Лизат опухоли, полученной от пациентки с раком молочной железы, использовали для получения генно-модифицированных зрелых ДК при использовании лентивируса, экспрессирующего CD40L+CXCL13+CD93 или CD40L+CXCL13, или только CD40L. Затем зрелые алло-ДК (1×10^4) совместно культивировали с CD16+CD56+ НК-клетками периферической крови (5×10^5) в среде для НК-клеток (Miltenyi) в присутствии 500 МЕ/мл IL2 в тройной повторности. Персистенция алло-ДК измеряли с помощью проточной цитометрии (CD86 и CD1a) через 48 ч после посева. В каждом условии жизнеспособные алло-ДК через 48 ч совместного культивирования не обнаруживали.

[0314] Активация В-клеток (Фиг. 12)

[0315] Лизат опухоли, полученный от пациентки с раком молочной железы, использовали для получения генно-модифицированных зрелых ДК при использовании лентивируса, экспрессирующего CD40L+CXCL13+CD93 или CD40L+CXCL13, или только CD40L. Затем зрелые алло-ДК (1×10^4) совместно культивировали с CD19+ В-клетками периферической крови ($2,5 \times 10^5$) в среде RPMI 1640 с добавкой 5% человеческой АВ сыворотки и 1 mM GlutaMAX в тройной повторности. Уровень активации В-клеток оценивали с помощью проточной цитометрии путем определения уровней экспрессии CD69 в CD19+ клетках на 4 день.

[0316] Результаты на Фиг. 10-12 демонстрируют синергические эффекты коэкспрессии всех трех рецепторов на рекомбинантных ДК. На Фиг. 10 пролиферацию Т-клеток использовали в качестве суррогатного маркера, указывающего на усиление клеточного иммунного ответа на рекомбинантные ДК. Наибольшее увеличение пролиферации Т-клеток показали тройные рекомбинантные ДК (CD40L+CXCL13+ и CD93). Аналогичным образом, на Фиг. 11, пролиферацию НК-клеток (естественных киллеров) в сокультуре с рекомбинантными ДК использовали в качестве другого суррогатного маркера усиления клеточного иммунного ответа *in vivo*. Точно так же, на Фиг. 11 наибольшее увеличение пролиферации НК-клеток наблюдали в сокультуре с тройной конструкцией. Наконец, на Фиг. 12, уровень активации В-клеток в сокультуре использовали в качестве суррогатного маркера активации В-клеток *in vivo*. Активацию В-

клеток определяли путем анализа совместно культивируемых клеток на экспрессию CD69 в CD19+ клетках на 4 день. В этих сокультурах тройные рекомбинантные ДК (CD40L+CXCL13+ и CD93) также демонстрировали максимальный уровень экспрессии CD69+, аналогичным образом указывающий на активацию гуморальной иммунной системы.

Стандартные методы

[0317] Стандартные методы молекулярной биологии описаны в Sambrook, Fritsch and Maniatis (1982 & 1989, 2nd Edition, 2001, 3rd Edition), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA). Стандартные методы также представлены в публикации Ausbel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols.1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY, в которой описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжей (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4).

[0318] Описаны методы очистки белка, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию (Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York). Описан химический анализ, химическая модификация, посттрансляционная модификация, получение слитых белков, гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech (2001) *BioDirectory*, Piscataway, N.J., pp. 384-391). Описаны производство, очистка и фрагментация поликлональных и моноклональных антител (Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow and Lane (1999) *Using Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, см. выше). Доступны стандартные методы для исследования взаимодействий лиганда/рецептора (см., например, Coligan, et al. (2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New York).

[0319] Все источники, цитируемые в настоящем изобретении, включены посредством отсылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, запись в базе данных (например, последовательности Genbank или записи GeneID), заявка на патент или патент были прямо и индивидуально указаны как включенные посредством отсылки. Это заявление о включении посредством отсылки по мнению Заявителей, в соответствии со статьей 37 C.F.R. §1.57(b)(1), относится к каждой отдельной публикации, записи в базе данных (например, последовательностям Genbank или записям GeneID), заявке на патент или патенту, каждый из которых четко идентифицирован в соответствии со статьей 37 C.F.R. §1.57(b)(2), даже если такая ссылка не находится непосредственно

рядом со специальным заявлением о включении посредством отсылки. Включение в рамки описания специальных заявлений о включении посредством отсылки, если таковые имеются, никоим образом не уменьшает значение этого общего заявления о включении посредством отсылки. Цитирование ссылок в настоящем изобретении не должно рассматриваться как признание того, что ссылка относится к предшествующему уровню техники, и не является признанием содержания или даты этих публикаций или документов.

[0320] Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами осуществления, описанными в настоящем изобретении. Фактически, различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем изобретении станут очевидными для специалистов в данной области из предшествующего описания и сопровождающих фигур. Предполагается, что такие модификации включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Дендритная клетка, содержащая одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и CXCL13.
2. Дендритная клетка по п.1, где одна или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот кодируют CD93.
3. Дендритная клетка, содержащая гетерологичный белок CD40L и гетерологичный белок CXCL13.
4. Дендритная клетка по п.3, дополнительно содержащая гетерологичный белок CD93.
5. Активированная антигеном дендритная клетка, где дендритная клетка содержит одну или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот, кодирующих CD40L и CXCL13.
6. Активированная антигеном дендритная клетка по п.5, где одна или более гетерологичных молекул нуклеиновых кислот кодируют CD93.
7. Активированная антигеном дендритная клетка по п.5 или п.6, где клетка активируется при контакте с одним или более антигенами.
8. Активированная антигеном дендритная клетка по п.7, где антиген является опухолевым антигеном.
9. Активированная антигеном дендритная клетка по п.7, где антиген является вирусным антигеном.
10. Активированная антигеном дендритная клетка по любому из пп. 7-9, где антиген является лизатом клетки.
11. Активированная антигеном дендритная клетка по п.10, где лизат клетки является аллогенным или аутологичным по отношению к активированной антигеном дендритной клетке.
12. Активированная антигеном дендритная клетка по п.10 или п.11, где лизат клетки является лизатом, включающим один или комбинацию лизатов аллогенных клеток меланомы.
13. Активированная антигеном дендритная клетка по п.12, где лизат аллогенной клетки меланомы является лизатом клетки DDM-1.7, лизатом клетки DDM-1.13 или их комбинацией.
14. Активированная антигеном дендритная клетка по любому из пп. 10-13, где лизат клетки является лизатом цельной клетки.
15. Активированная антигеном дендритная клетка по любому из пп. 10-13, где лизат клетки является лизатом опухолевой клетки.
16. Композиция, содержащая клетку по любому из пп. 1-15, где композиция не содержит гетерологичный антиген.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая клетку по любому из пп. 1-16.
18. Способ лечения солидной опухоли, рака или злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение субъекту любой из дендритных

клеток или композиций по пп. 1-4 или 16-17.

19. Способ лечения солидной опухоли, рака или злокачественного новообразования у субъекта, включающий введение субъекту любой из дендритных клеток или композиций по пп. 5-14 или 15-17.

20. Способ по п.19, дополнительно включающий:

скрининг профиля экспрессии белков в образце резецированной опухоли или биопсии субъекта для перекрестного сравнения профиля экспрессии белков лизата аллогенной опухоли перед введением; и

введение активированной лизатом аллогенной опухоли дендритной клетки или композиции активированной дендритной клетки, если по меньшей мере три фрагмента в профиле экспрессии белков образца резецированной опухоли или биопсии перекрестно совпадают с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли.

21. Способ по п.20, где лизат аллогенной опухоли получен из аллогенной линии клеток меланомы, выбранной из группы, состоящей из DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинации.

22. Способ по любому из пп. 18-21, где дендритная клетка не имеет такой же тип HLA, что и субъект.

23. Способ по любому из пп. 18-22, где рак представляет собой солидную опухоль, выбранную из группы, состоящей из фибросаркомы, миксосаркомы, липосаркомы, хондросаркомы, остеосаркомы и других сарком, синовиомы, мезотелиомы, опухоли Юинга, лейомиосаркомы, рабдомиосаркомы/рака толстой и прямой кишки, лимфоидного злокачественного новообразования, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака легкого, рака яичника, рака предстательной железы, гепатоцеллюлярной карциномы, плоскоклеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, аденокарциномы, карциномы потовых желез, медуллярной карциномы щитовидной железы, папиллярной карциномы щитовидной железы, феохромоцитом, карциномы сальных желез, папиллярной карциномы, папиллярных аденокарцином, медуллярной карциномы, бронхогенной карциномы, почечно-клеточной карциномы, гепатомы, карциномы желчных протоков, хориокарциномы, опухоли Вильмса, рака шейки матки, опухоли яичка, семиномы, карциномы мочевого пузыря, меланомы и опухолей ЦНС (например, глиомы ствола головного мозга и смешанных глиом), глиобластомы (также известной как мультиформная глиобластома), астроцитомы, лимфомы ЦНС, герминомы, медуллобластомы, шванномы, краниофарингиомы, эпендимомы, пинеаломы, гемангиобластомы, невриномы слухового нерва, олигодендроглиомы, менангиомы, нейробластомы, ретинобластомы и метастазов в головной мозг).

24. Способ по любому из пп. 18-23, где введение осуществляют путем внутриопухолевой, перитуморальной, внутрикожной, подкожной, внутримышечной или внутрибрюшинной инъекции.

25. Способ по любому из пп. 18-24, где введение осуществляют путем подкожной, внутриопухолевой или внутрикожной инъекции.

26. Способ по любому из пп. 18-25, где дендритную клетку или композицию криоконсервируют и размораживают перед введением.

27. Способ по п.18, где дендритную клетку не стимулируют антигеном перед введением.

28. Набор, содержащий любую из дендритных клеток или композиций по пп. 1-17, где дендритная клетка или композиция заморожена или криоконсервирована в контейнере и, необязательно, содержащий криоконсервированный лизат аллогенной опухоли в отдельном контейнере.

29. Набор, содержащий любую из дендритных клеток или композиций по пп. 1-17, где дендритная клетка или композиция заморожена или криоконсервирована в контейнере и, необязательно, содержащий замороженный или криоконсервированный лизат аутологичной опухоли в отдельном контейнере.

30. Набор, содержащий любую из дендритных клеток или композиций по пп. 10-15 или п.17, где активированная дендритная клетка или композиция заморожена в контейнере.

31. Набор по п.29 или п.30, дополнительно включающий отдельные контейнеры, содержащие один или более буферов, и необязательно содержащий одно или более активирующих средств.

32. Набор по п.31, дополнительно содержащий инструкции по инкубации и/или обработке дендритных клеток или композиций.

33. Способ лечения рака у субъекта, включающий:

скрининг профиля экспрессии белков в образцах резецированной опухоли или биопсии субъекта с целью перекрестного сравнения с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли перед введением;

если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков в образцах резецированной опухоли или биопсии совпадают с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли, введение субъекту какой-либо из дендритных клеток или композиций по пп. 1-15; или

если по меньшей мере три фрагмента профиля экспрессии белков в образцах резецированной опухоли или биопсии не совпадают с профилем экспрессии белков лизата аллогенной опухоли, то

(а) введение субъекту композиции, включающей любую из стимулированных лизатом аутологичной опухоли дендритных клеток или композиций по пп. 1-10, п.14 или п.16 или

(b) введение субъекту любой из клеток или композиций по пп. 1-4 или п.16, которые не были стимулированы антигеном.

34. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту любой из дендритных клеток или композиций по пп. 1-4 или п.16, где дендритная клетка или композиция не была стимулирована опухолевым антигеном.

35. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту любой из

дендритных клеток или композиций по пп. 1-17, где дендритная клетка стимулирована опухолевым антигеном или лизатом.

36. Способ активации иммунной системы, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества любой из дендритных клеток или композиций по пп. 1-17.

37. Способ получения незрелых дендритных клеток, включающий:

культивирование CD14⁺ и/или CD1a⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, с получением незрелых дендритных клеток *in vitro*.

38. Способ по п.37, дополнительно включающий контакт незрелых дендритных клеток с композицией, включающей одно или более из: ФНО- α , IL-1 β , IFN- α , IFN- γ и rIC.

39. Способ по п.37, дополнительно включающий получение CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

40. Способ по п.39, где получение включает контакт CD14⁺ моноцитов с одним или более векторами, кодирующими CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

41. Способ по п.40, где вектор является рекомбинантным аденовирусным вектором, рекомбинантным ретровирусным вектором или рекомбинантным лентивирусным вектором, или их комбинацией.

42. Способ по п.40, где получение CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93, включает контакт моноцитов с одной или более конструкциями CRISPR, что приводит к получению CD14⁺ моноцитов, гетерологично экспрессирующих CD40L, CXCL13 и, необязательно, CD93.

43. Способ по п.42, где конструкция CRISPR представляет собой CAS9.

44. Способ по любому из пп. 40-43, где контакт включает трансфекцию, трансдукцию, электропорацию, инфицирование или их любую комбинацию.

45. Способ по п.37, дополнительно включающий замораживание незрелых дендритных клеток.

46. Способ по п.37, дополнительно включающий контакт незрелых дендритных клеток с лизатом аутологичной опухоли или лизатом аллогенной опухоли перед созреванием.

47. Способ по п.46, дополнительно включающий замораживание дендритных клеток после созревания.

48. Способ по п.37, где CD14⁺ моноциты дополнительно модифицированы для гетерологичной экспрессии CD93.

49. Способ по п.46, где лизат аллогенной опухоли получен из аллогенной линии клеток меланомы, выбранной из группы, состоящей из DDM-1.7, DDM-1.13 или их комбинации.

50. Способ по п.46, где лизат является лизатом цельной клетки.

51. Способ по любому из пп. 18-27 или пп. 33-36, где у пациента усилена реакция трансплантата против опухоли (GVT).

52. Способ по любому из пп. 18-27 или пп. 33-36, где в течение периода 4-14 дней после введения дендритных клеток или композиций пациенту дополнительно вводят ингибитор иммунной контрольной точки, включающий любой один или комбинацию двух ингибиторов контрольных точек, включающих ингибитор PD-1 или PD-L1 (B7-H1), такой как антитело к PD-1, включающее ниволумаб (Ниволумаб, Bristol-Myers Squibb), пембролизумаб/ламбролизумаб, также известен как МК-3475 (Китруда, Merck), пидилизумаб (Curetech), AMP-224 (Amplimmune) или антитело к PD-L1, включающее MPDL3280A (Roche), MDX-1105 (Bristol Myer Squibb), MEDI-4736 (AstraZeneca) и MSB-0010718 C (Merck), антагонист CTLA-4, такой как антитело к CTLA-4, включающее антитело к CTLA4 Ервой™ (ипилимумаб, Bristol-Myers Squibb), тремелимумаб (Pfizer), Тицилимумаб (AstraZeneca) или AMG-224 (Glaxo Smith Kline), или опухолеспецифичное антитело трастузумаб (Герцептин) для лечения рака молочной железы, ритуксимаб (Ритуксан) для лечения лимфомы или цетуксимаб (Эрбитукс).

53. Способ по любому из пп. 18-27, пп. 33-36, п.51 или п.52, дополнительно включающий введение одного или более дополнительных средств, обычно используемых для лечения рака.

54. Способ по п.53, где дополнительное средство выбрано из радиации, химиотерапии, конъюгата антитела-лекарственного средства и иммуномодулирующего антитела.

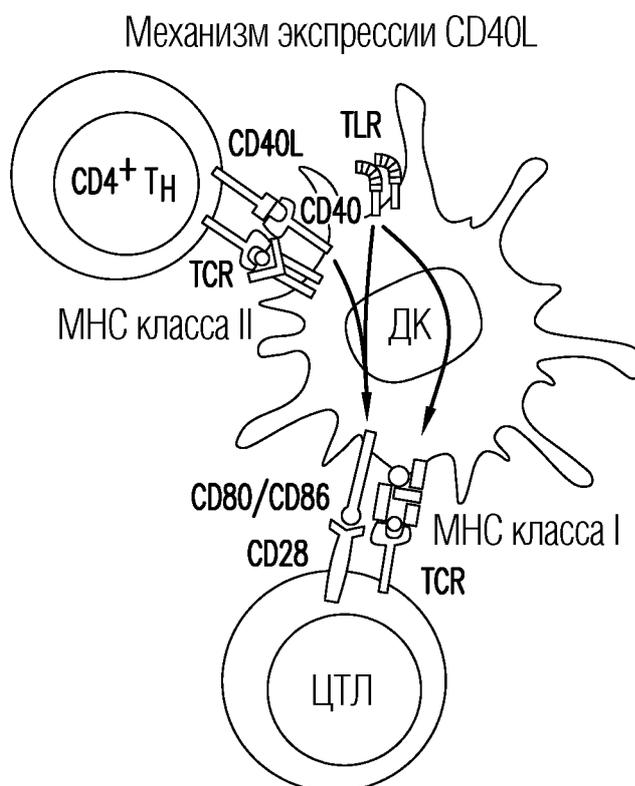
55. Способ по п.54, где химиотерапия включает цисплатин, карбоплатин, паклитаксел, доцетаксел, гемцитабин, винорелбин, винбластин, иринотекан, этопозид или пеметрексед, или их комбинации, или их фармацевтически приемлемую соль.

56. Способ по п.54, где иммуномодулирующее антитело является антителом к PD-1, антителом к PD-L1, антителом к CD40, антителом к CTLA-4 или антителом к OX40, или их любой комбинацией.

57. Способ по п.54, где конъюгат антитела-лекарственного средства направленно воздействует на киназу c-Met, LRRC15, EGFR, или CS1, или их любую комбинацию.

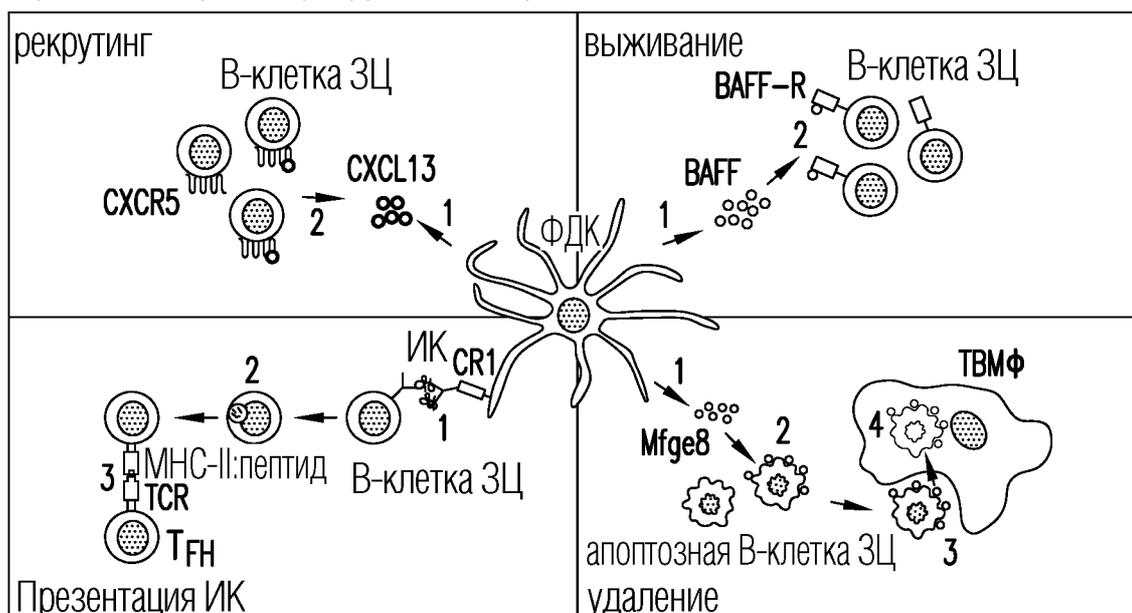
58. Способ по любому из пп. 18-27, пп. 33-36, п.51 или пп. 52-54, где лечение или усиление иммунного ответа повторяют периодически в течение периодов времени от одного раза в 5 дней, 10 дней, одного раза в 14 дней, одного раза в 21 день, одного раза в месяц до одного раза в два месяца, до одного раза в 3 месяца, до одного раза в 4 месяца, до одного раза в 5 месяцев, до одного раза в 6 месяцев, или один раз в 7 месяцев, или один раз в 8 месяцев, или один раз в 9 месяцев, или один раз в 10 месяцев, или один раз в 11 месяцев, или один раз в год в качестве поддерживающего лечения, до тех пор, пока у пациента наблюдается улучшение или стабильное/непрогрессирующее заболевание.

По доверенности

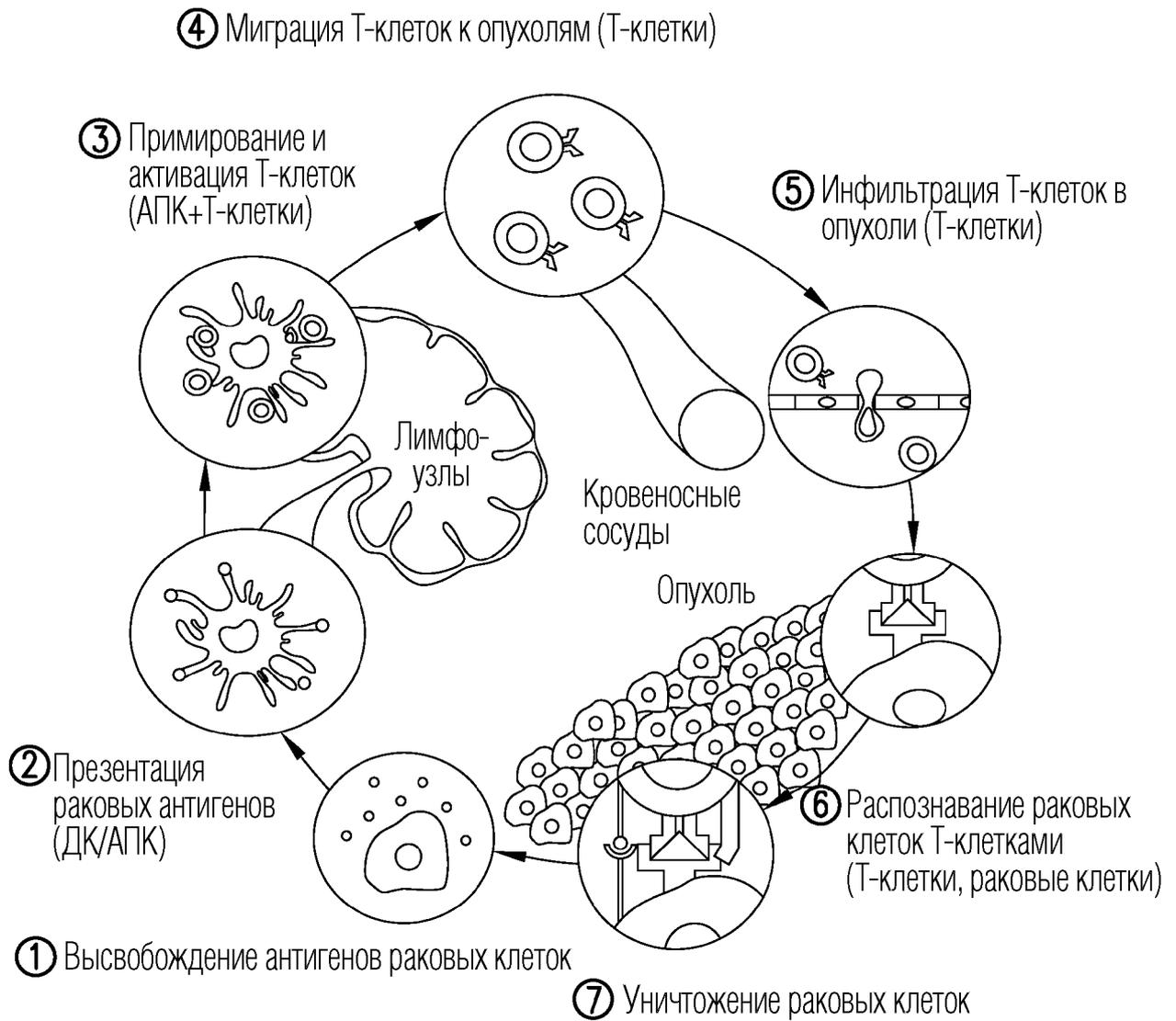


ФИГ. 1А

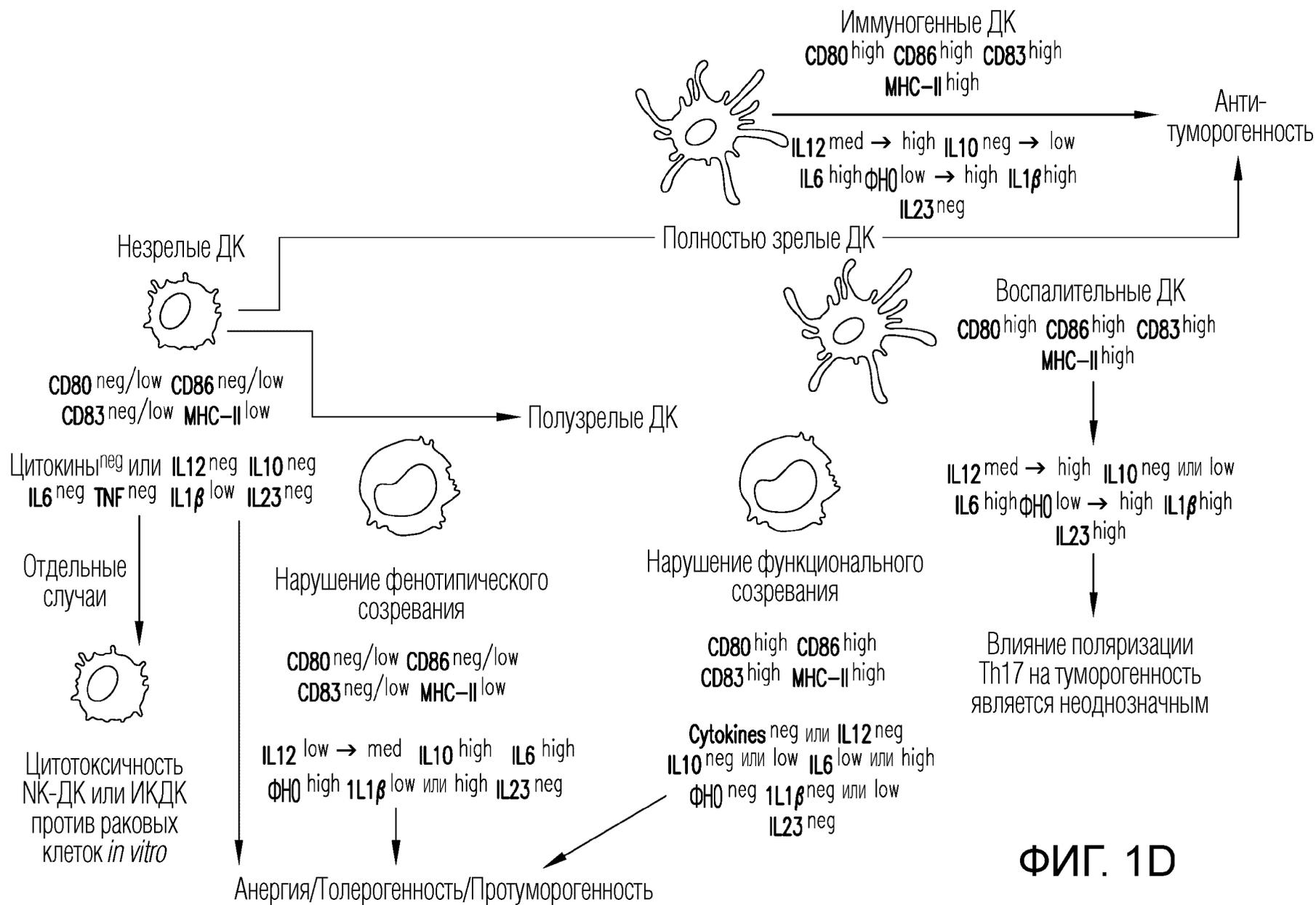
Процесс иммунного рекрутинга экспрессии CXCL13



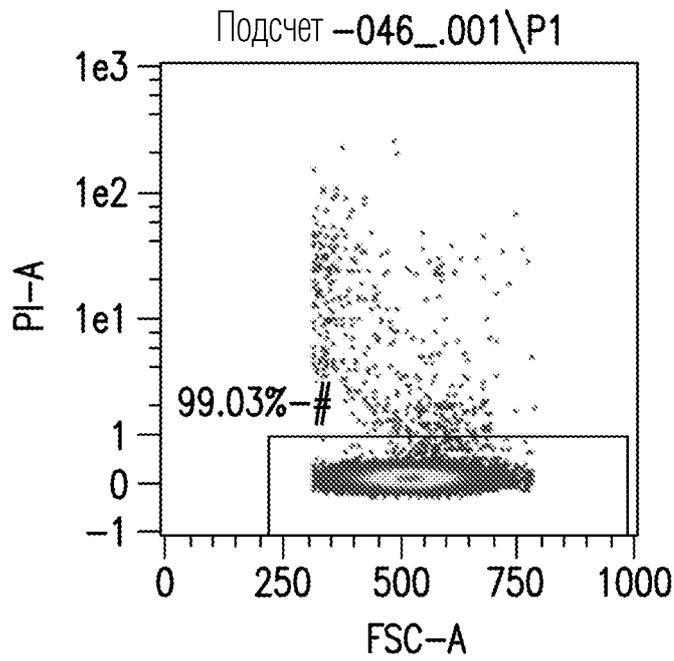
ФИГ. 1В



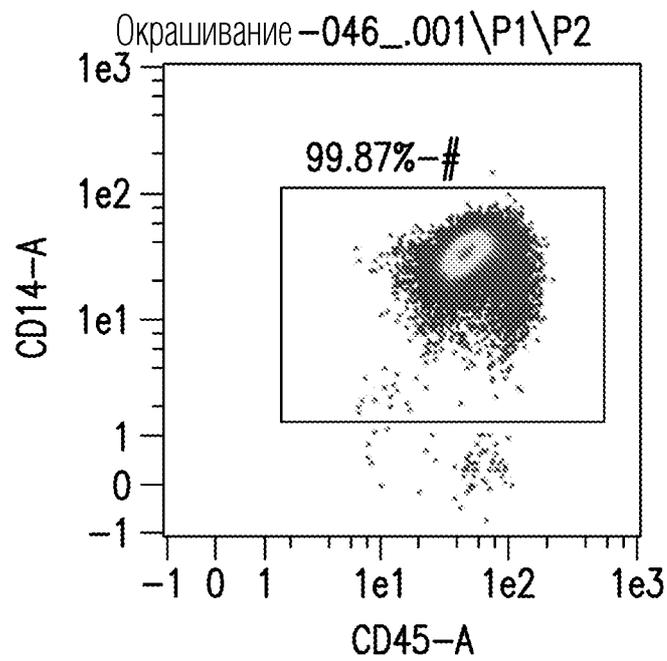
ФИГ. 1С



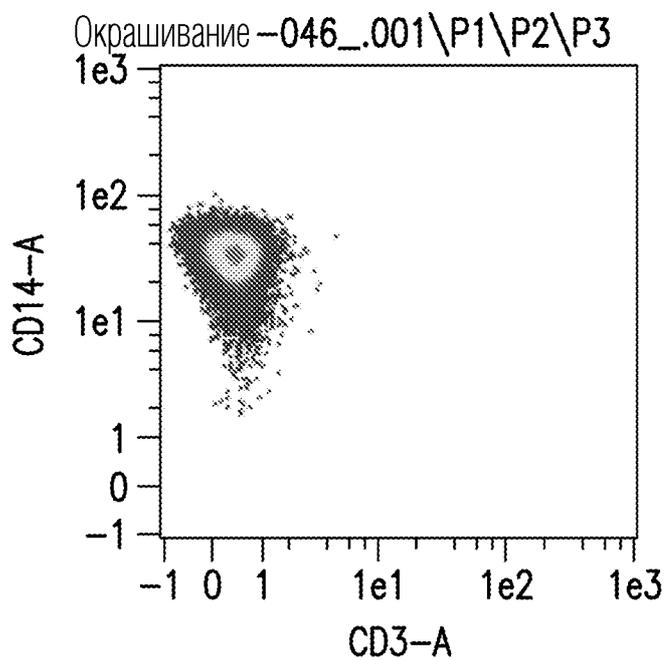
ФИГ. 1D



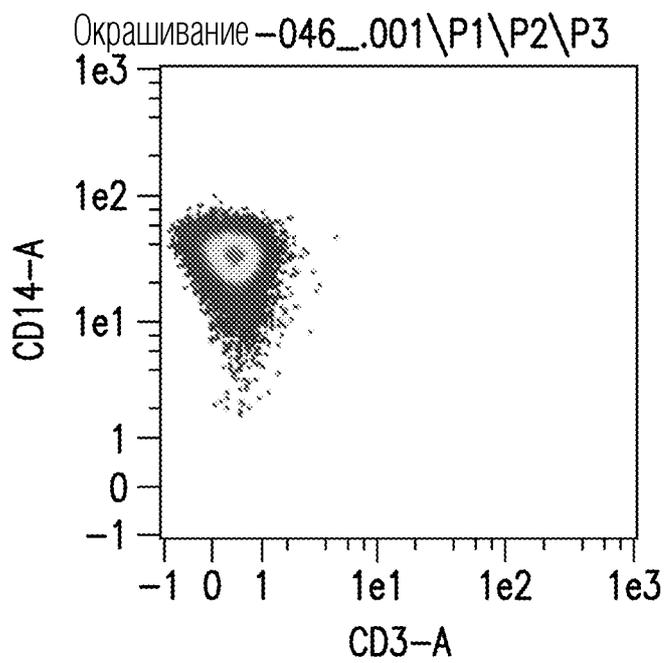
ФИГ. 2А



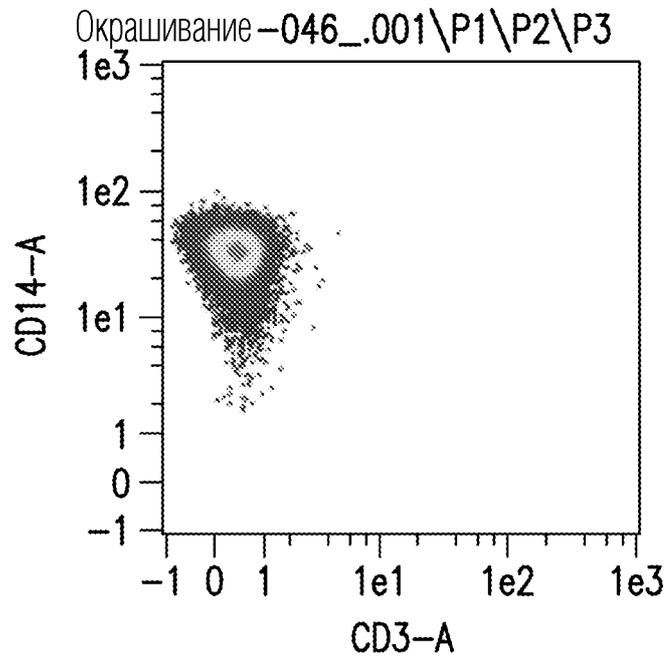
ФИГ. 2В



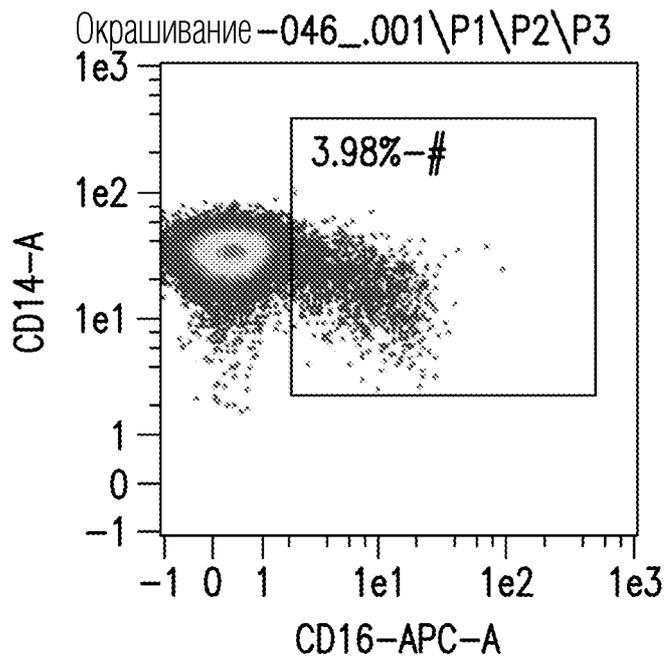
ФИГ. 2С



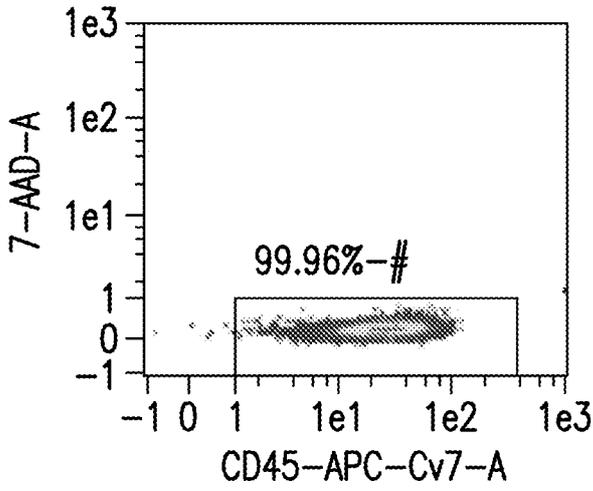
ФИГ. 2D



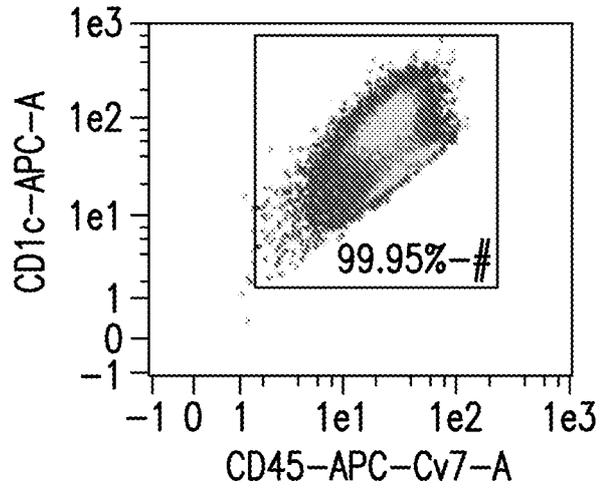
ФИГ. 2Е



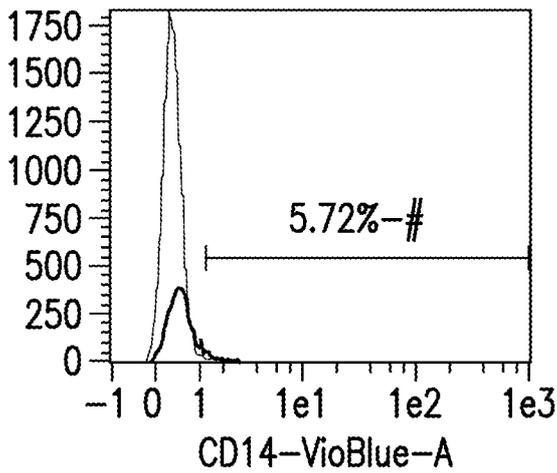
ФИГ. 2F



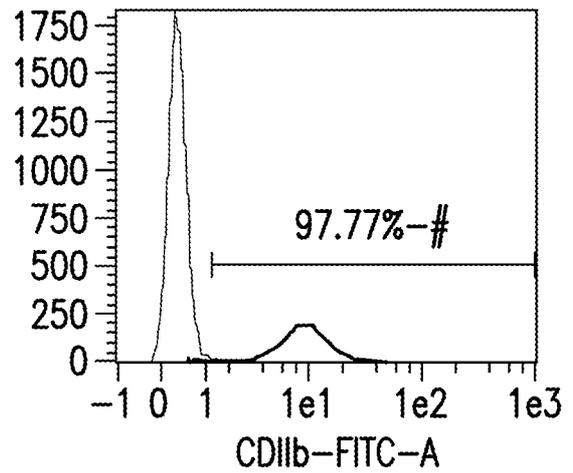
ФИГ. 3А



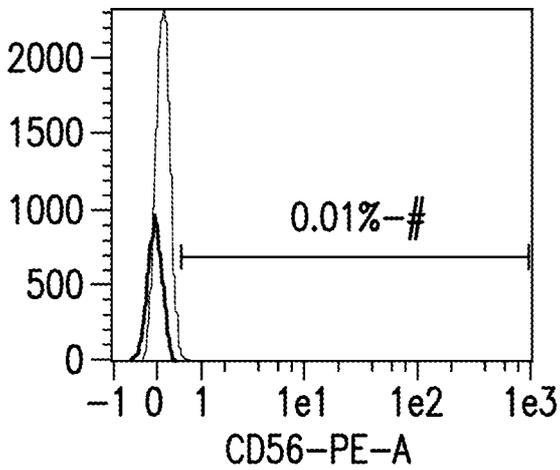
ФИГ. 3В



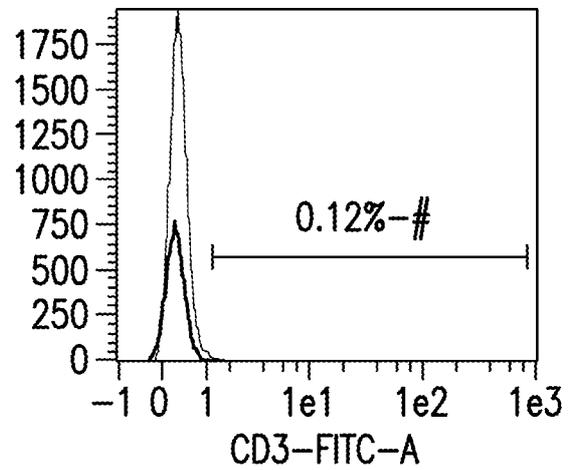
ФИГ. 3С



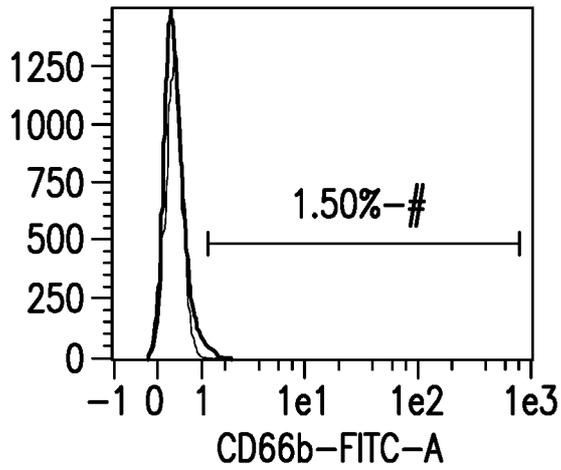
ФИГ. 3D



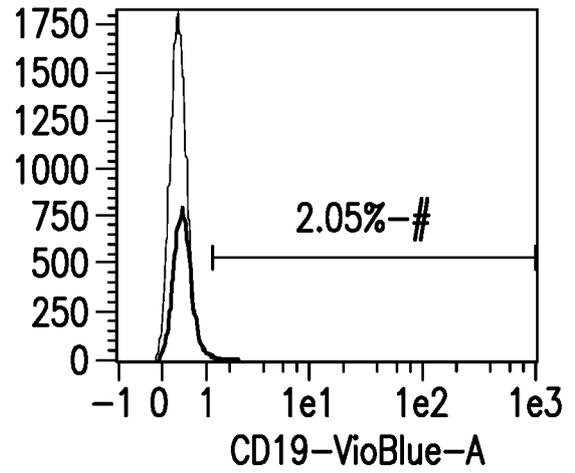
ФИГ. 3Е



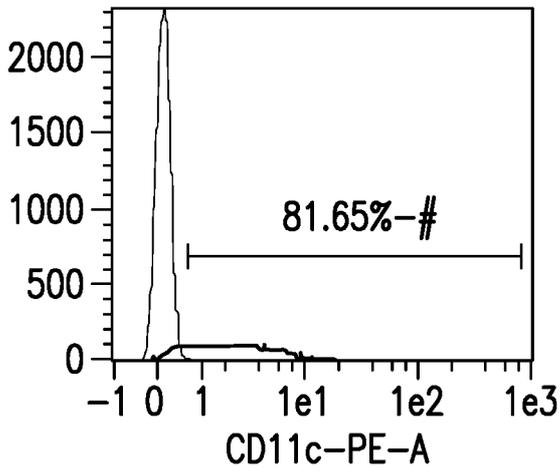
ФИГ. 3F



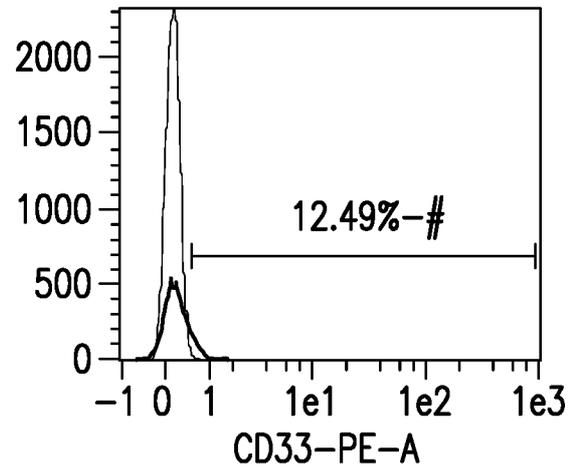
ФИГ. 3Г



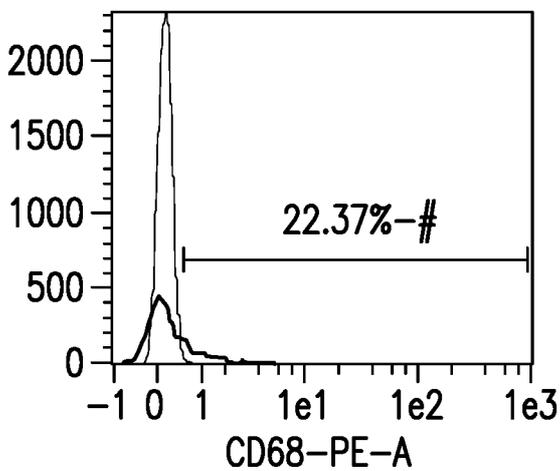
ФИГ. 3Н



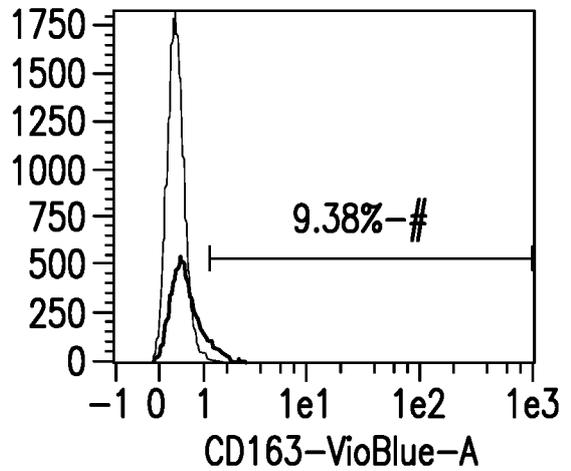
ФИГ. 3И



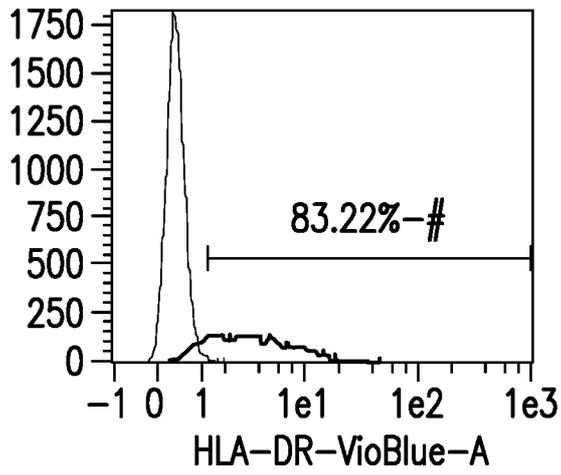
ФИГ. 3Й



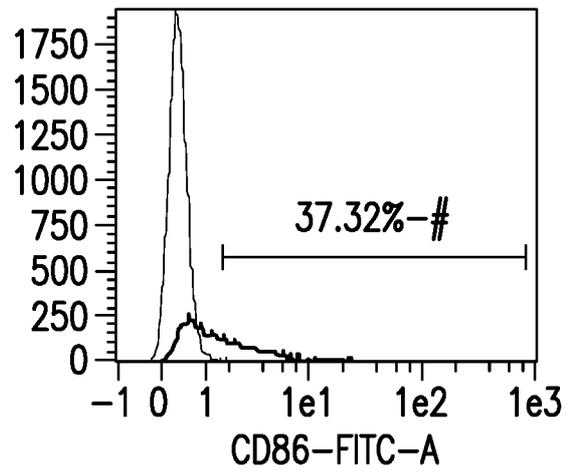
ФИГ. 3К



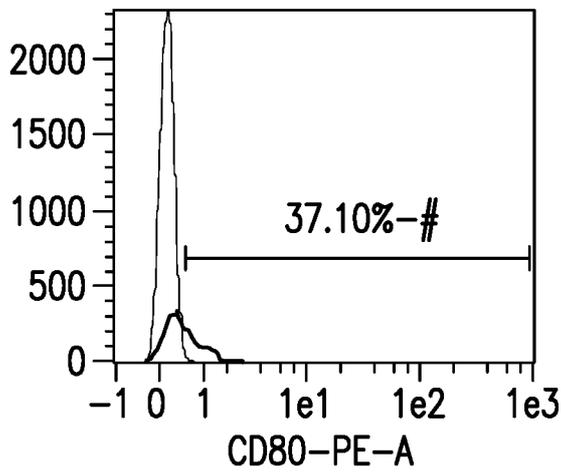
ФИГ. 3Л



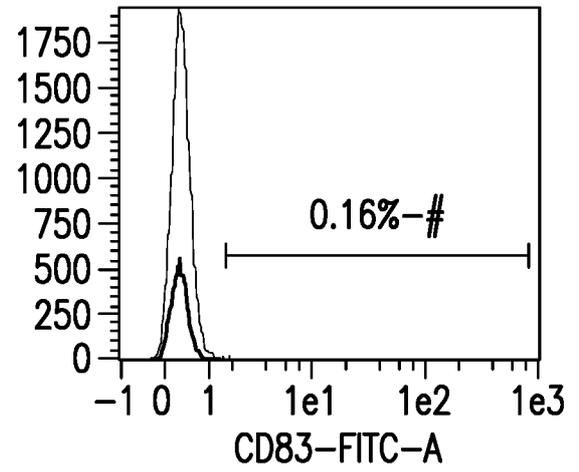
ФИГ. 3М



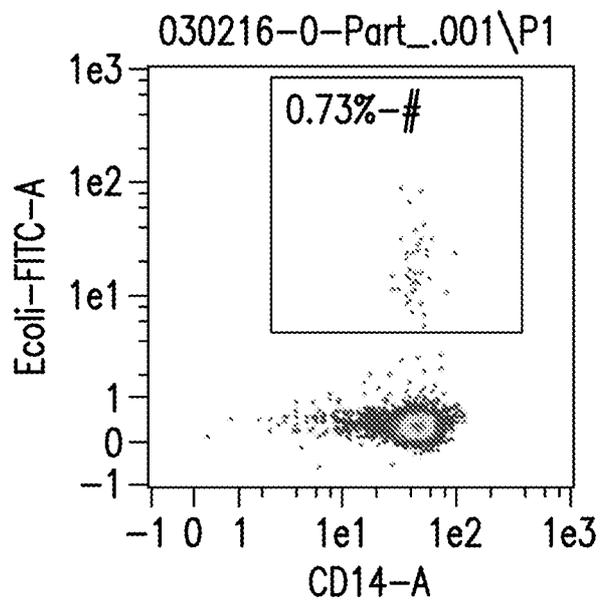
ФИГ. 3Н



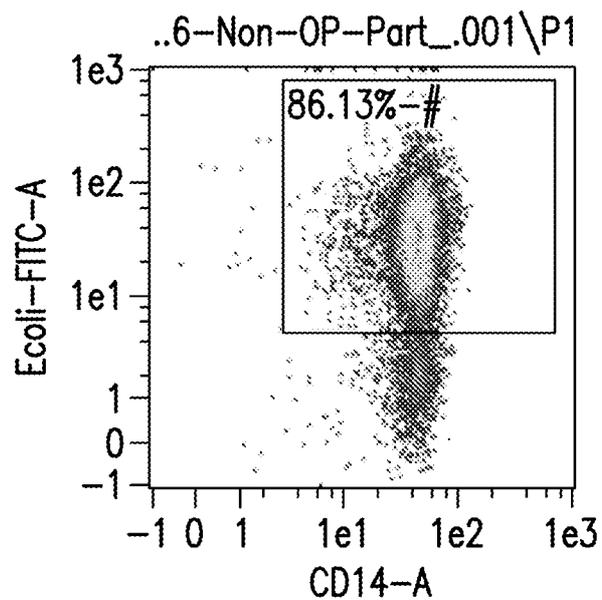
ФИГ. 3О



ФИГ. 3Р

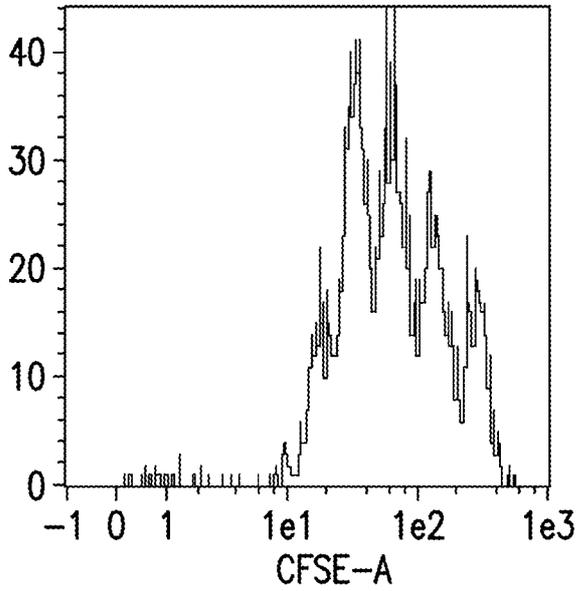


ФИГ. 4А



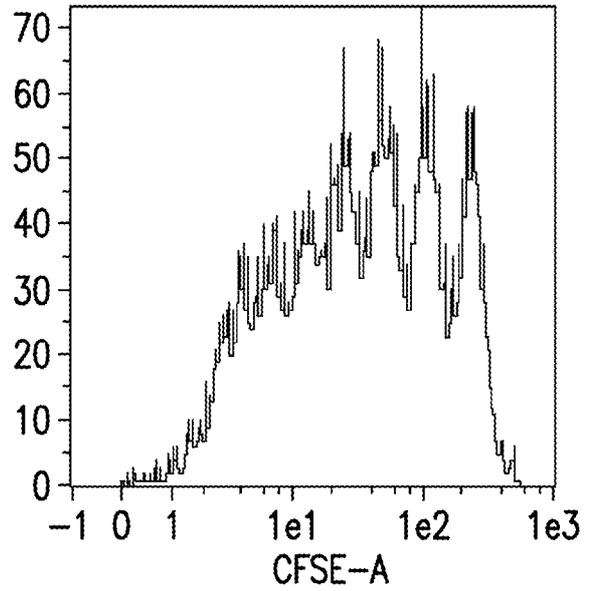
ФИГ. 4В

День4 - Окрашивание - III-71-4.001\Р1\Р2



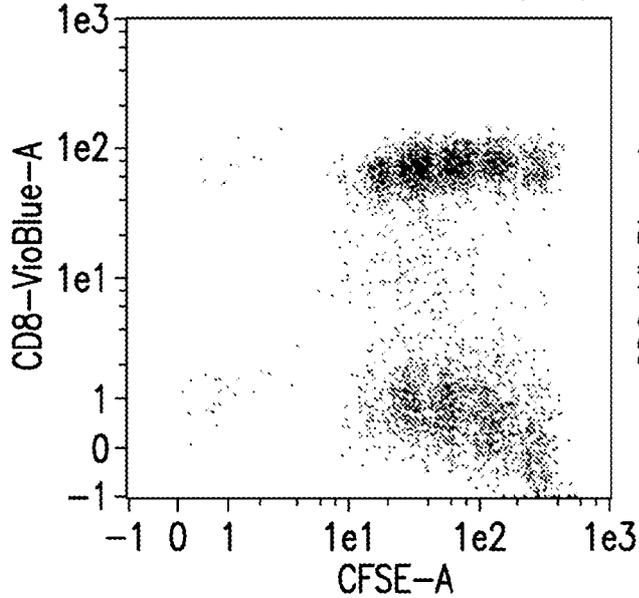
ФИГ. 5А

Окрашивание - III-4.001\Р1\Р2



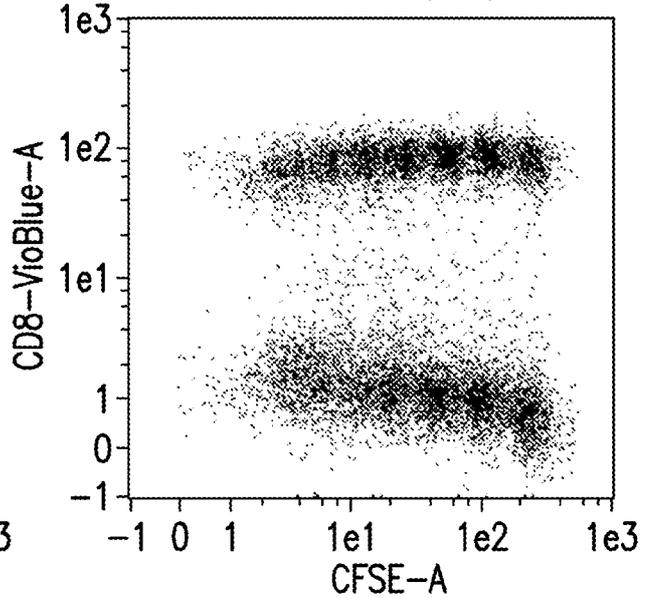
ФИГ. 5В

День4 - Окрашивание - III-71-4.001\Р1\Р2



ФИГ. 5С

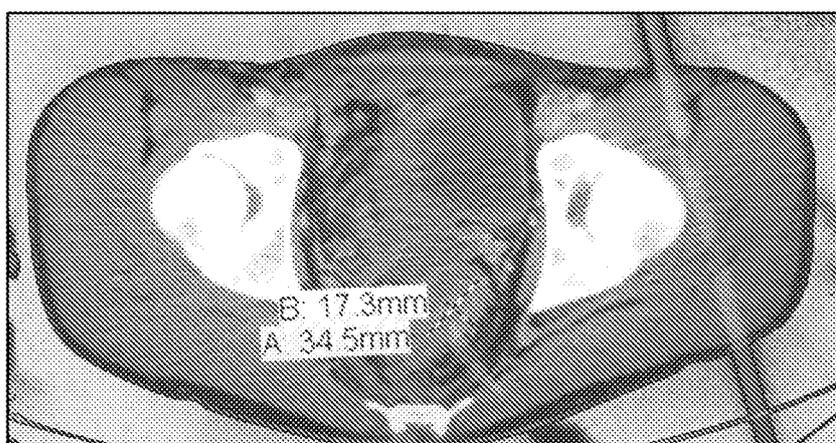
Окрашивание - III-4.001\Р1\Р2



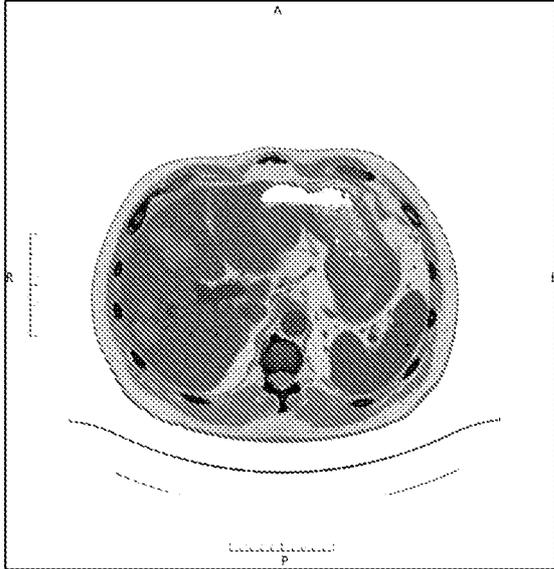
ФИГ. 5D



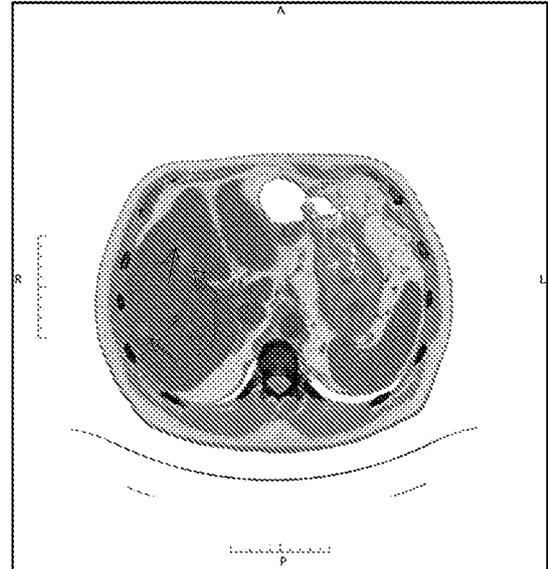
ФИГ. 6А



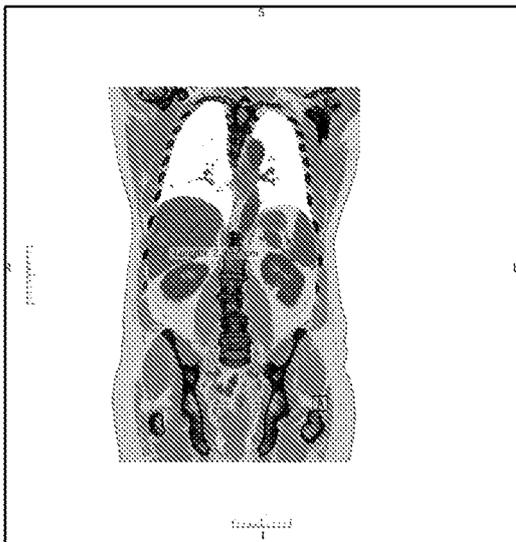
ФИГ. 6В



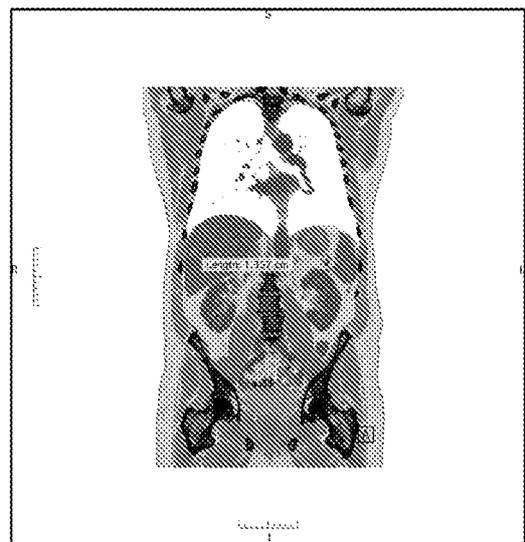
ΦΙΓ. 7Α



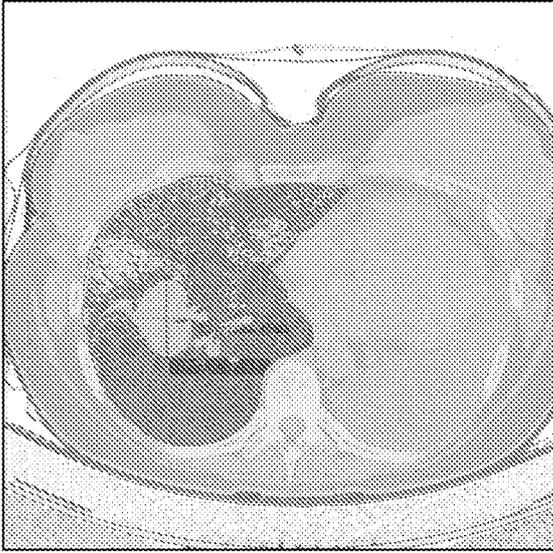
ΦΙΓ. 7Β



ΦΙΓ. 7C



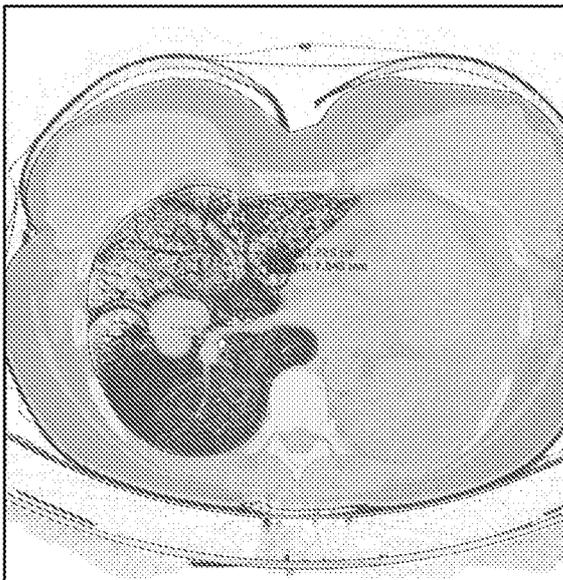
ΦΙΓ. 7D



ФИГ. 8А



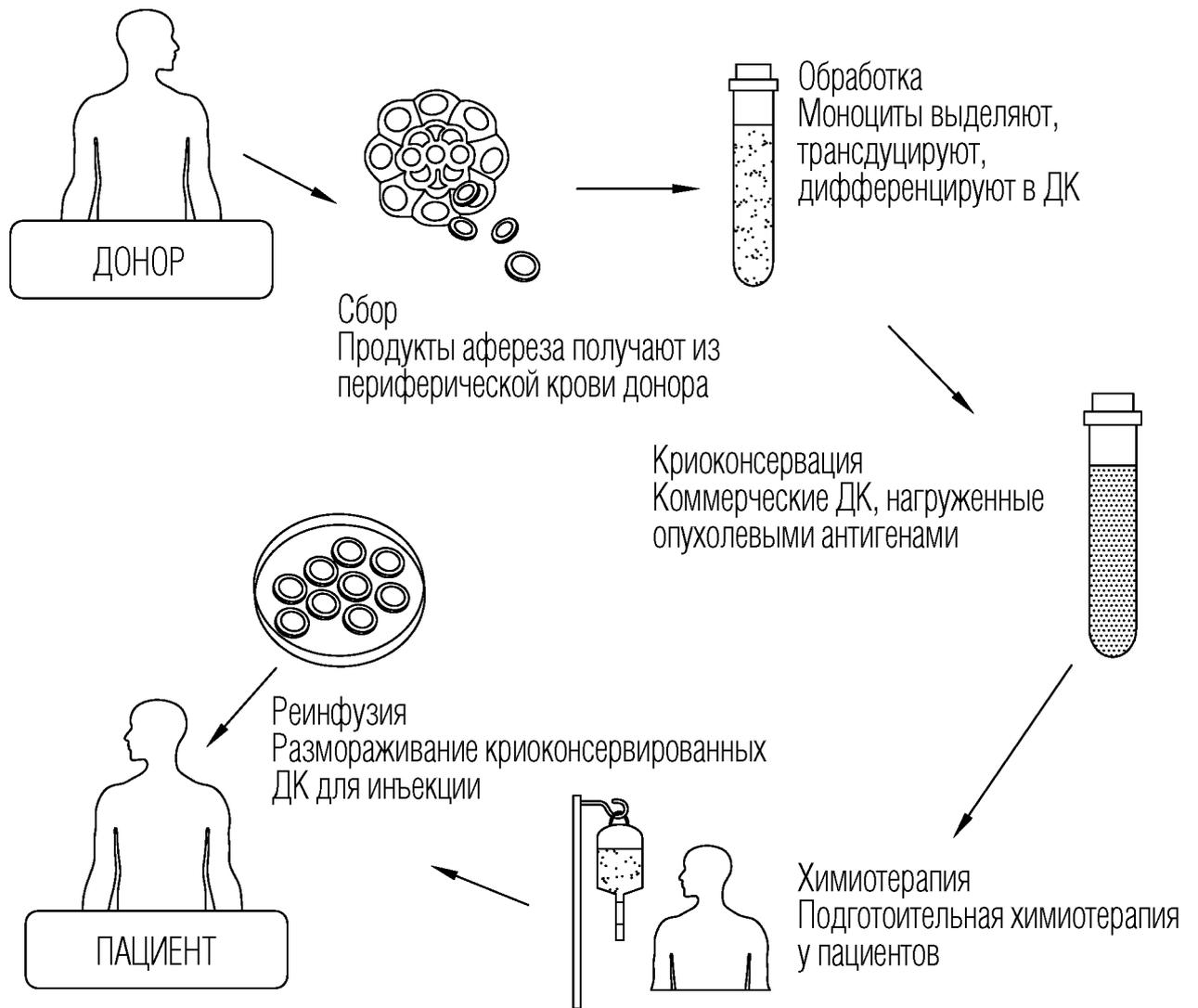
ФИГ. 8В



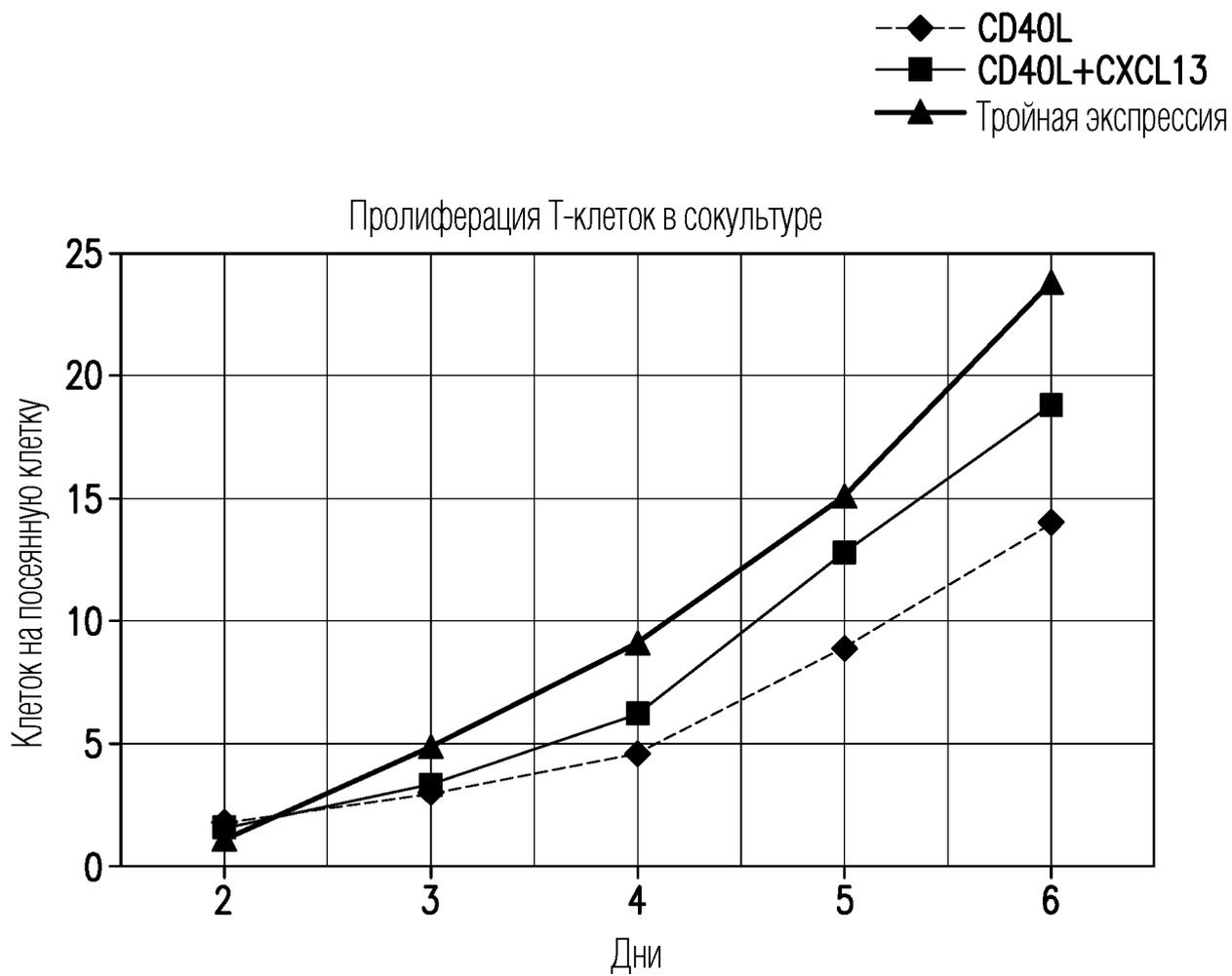
ФИГ. 8С



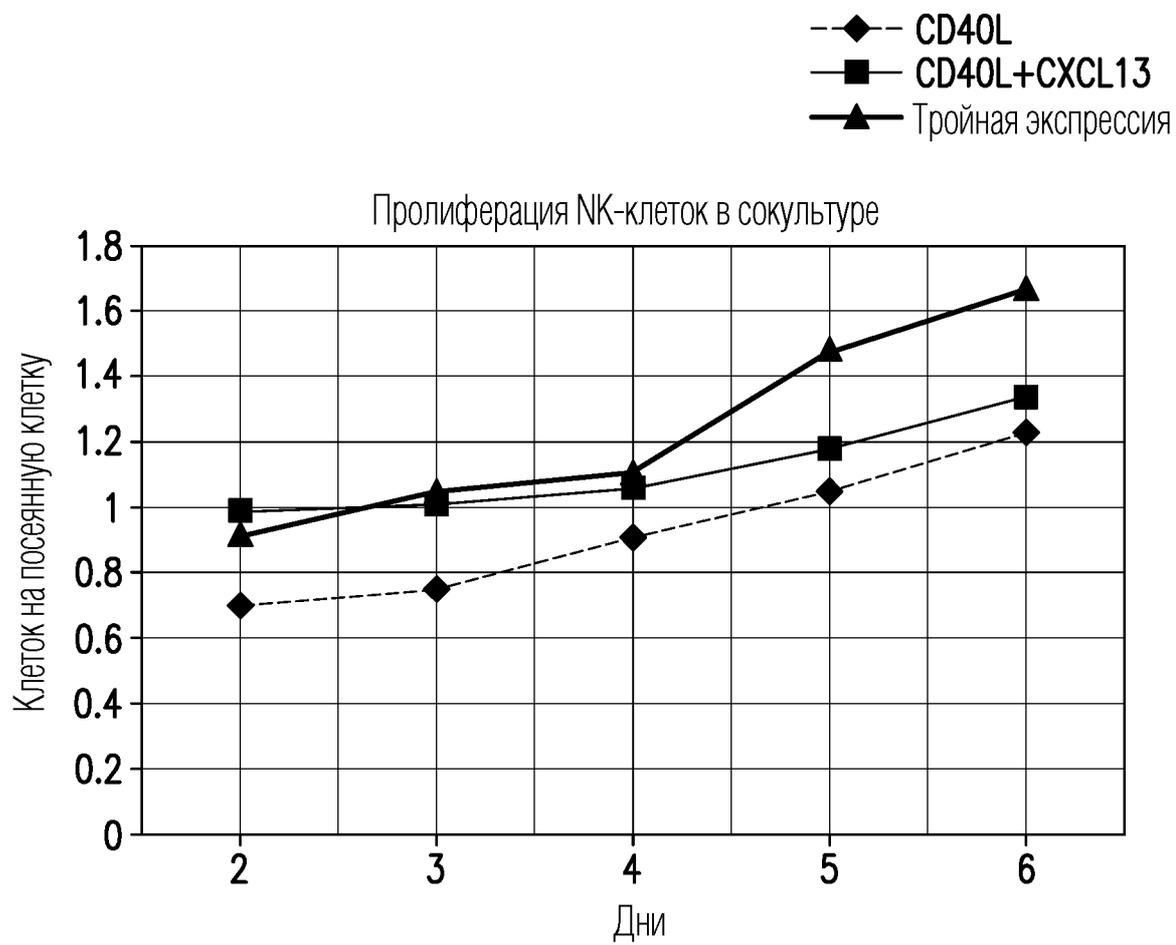
ФИГ. 8D



ФИГ. 9

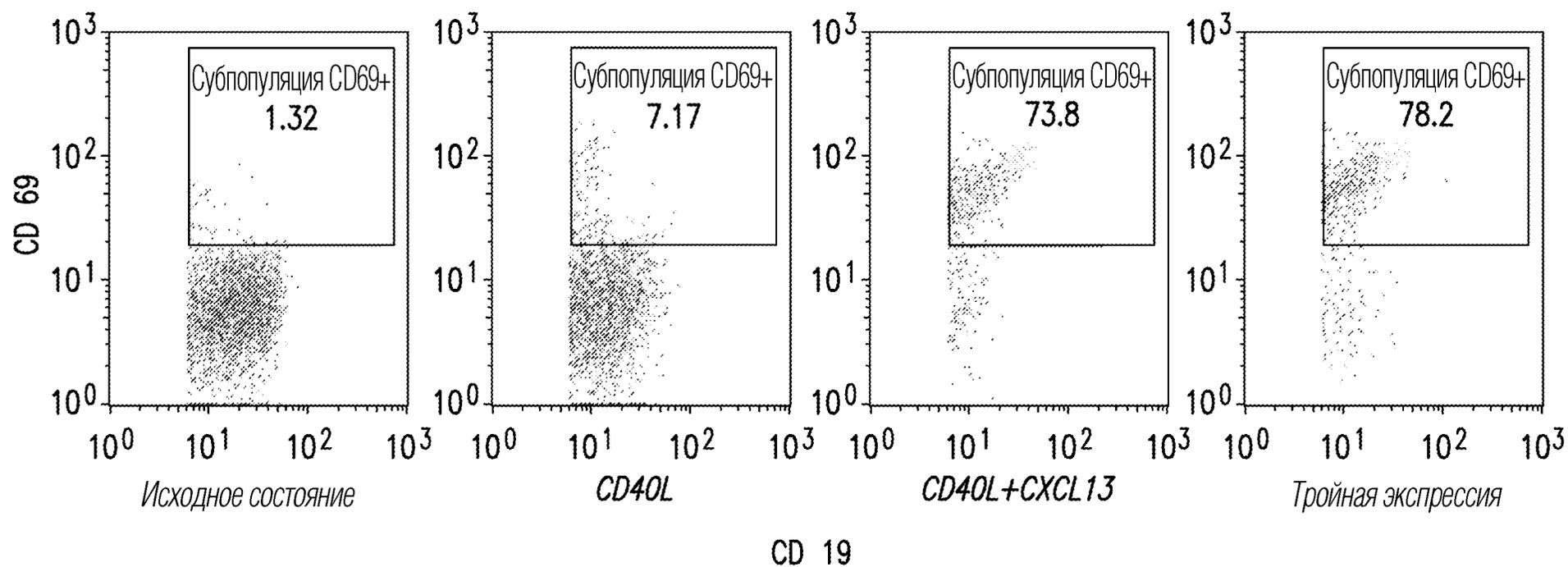


ФИГ. 10



ФИГ. 11

Активация В-клеток



ФИГ. 12