(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202190662 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.06.11

(22) Дата подачи заявки
2019.09.05

(51) Int. Cl. ***A61K 39/395*** (2006.01)
A61K 35/17 (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К CD19 И ЕСТЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ-КИЛЛЕРЫ

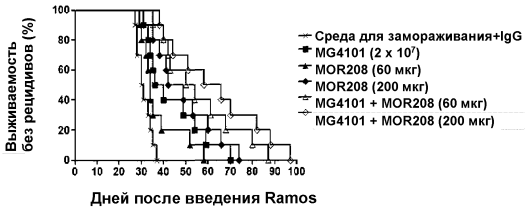
(31) **10-2018-0109093**
(32) **2018.09.12**
(33) **KR**
(86) **PCT/KR2019/011474**
(87) **WO 2020/055040 2020.03.19**

(71) Заявитель:
ГРИН КРОСС ЛЭБ СЕЛЛ КОРПОРЕЙШН (KR); МОРФОСИС АГ (DE)

(72) Изобретатель:
Хер Дзунг Хиун, Дзунг Ми Йоунг, Гвон Су Хиун, Лим Хо Йонг, Чо Сунг Йоо, Вон Сунг Йонг, Хванг Ю Киеонг (KR), Дзан Энделл, Рэйнер Боксхаммер (DE)

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

(57) Настоящее изобретение предлагает фармацевтическую комбинацию, содержащую антитело, специфичное к CD19, и естественные клетки-киллеры, а также способ лечения с их применением. Такая фармацевтическая комбинация способна проявлять синергетические терапевтические эффекты в отношении злокачественной опухоли В-клеточного происхождения, такой как неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз и/или острый лимфобластный лейкоз.



202190662 A1

202190662 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567692EA/061

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМБИНАЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОПУХОЛИ, СОДЕРЖАЩИЕ АНТИТЕЛО К CD19 И ЕСТЕСТВЕННЫЕ КЛЕТКИ-КИЛЛЕРЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Вариант осуществления настоящего изобретения предлагает фармацевтическую комбинацию, содержащую антитело к CD19 и естественные клетки-киллеры, которые оказывают синергетическое терапевтическое действие на злокачественную опухоль В-клеточного происхождения, такую как неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и/или острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ).

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Естественные клетки-киллеры (NK-клетки), как известно, представляют собой лимфоидные клетки, которые распознают мишень по нерестриктированному по MHC способу, в отличие от Т-клеток, и играют важную роль во врожденных иммунных ответах. Естественные клетки-киллеры могут оказывать противовирусное и противораковое действие. В частности, естественные клетки-киллеры играют роль в непосредственном уничтожении злокачественной опухоли или в индукции активности дендритных клеток или опухолеспецифичных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) для устранения аномальных клеток, в которых развились опухоли или развиваются опухоли. Кроме того, что касается противораковой эффективности естественных клеток-киллеров, было доказано, что применение аллогенных естественных клеток-киллеров, имеющих несовпадение с парами лиганд-иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), при лечении больных злокачественным новообразованием является гораздо более эффективным и безопасным, чем применение собственных естественных клеток-киллеров.

С другой стороны, молекулы CD19 человека представляют собой рецепторы клеточной поверхности, экспрессируемые на поверхности В-клеток человека, например, пре-В-клеток, незрелых В-клеток на ранней стадии развития, зрелых В-клеток и злокачественных В-клеток. Фактически, большинство злокачественных опухолей В-клеточного происхождения экспрессируют CD19, включая неходжкинскую лимфому, хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ) и острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ). Следовательно, антитела к CD19 могут связываться с антигенами CD19 в качестве мишеней и, таким образом, могут использоваться в терапевтической иммунотерапии вышеупомянутых злокачественных опухолей В-клеточного происхождения.

Несмотря на недавние открытия и разработки нескольких противораковых средств, из-за плохого прогноза для многих типов злокачественных новообразований, включая опухоли, экспрессирующие CD19, все еще существует потребность в улучшенном способе или терапевтическом средстве для лечения таких типов злокачественных новообразований. Соответственно, авторы настоящего изобретения подтвердили, что комбинированное введение естественных клеток-киллеров и антитела, специфичного к CD19, имеет синергетический эффект при лечении злокачественных лимфом В-

клеточного происхождения, и осуществили настоящее изобретение.

Список ссылок. Непатентная литература: Nadler et al., J. Immunol., 131: 244-250 (1983)

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая задача

Целью настоящего изобретения является предоставление комбинированной терапии с использованием антитела, специфичного к CD19, и естественных клеток-киллеров или их комбинации.

Решение задачи

Для достижения вышеуказанной цели вариант осуществления настоящего изобретения может предложить фармацевтическую комбинацию для лечения злокачественного новообразования, содержащую антитело, специфичное к CD19, и естественные клетки-киллеры (NK-клетки).

Антитело может иметь вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2) и область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3).

Антитело может иметь вариабельную область легкой цепи, содержащую область LCDR1 из RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Антитело может иметь вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2) и область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), и вариабельную область легкой цепи, содержащую область LCDR1 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 из RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Антитело может содержать вариабельную область тяжелой цепи EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 8) и вариабельную область легкой цепи DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNL NSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 9).

Антитело может содержать константную область тяжелой цепи ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10).

Антитело может содержать константную область легкой цепи RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11).

NK-клетки могут быть получены с помощью способа, включающего стадию (i) проведения стационарного культивирования NK-клеток в культуральной среде, содержащей антитела к CD3, цитокины и питающие клетки, для стимуляции межклеточных контактов, стадию (ii) добавления цитокинов, антитела к CD3 и питающих клеток для повторной стимуляции и повторного проведения стационарного культивирования для индукции межклеточных контактов, а также стадию (iii) добавления среды, содержащей цитокины, к клеткам и проведения стационарного или суспензионного культивирования при постоянном поддержании концентрации клеток и концентрации цитокинов.

NK-клетки могут быть получены с помощью способа, включающего стадию совместного культивирования выделенных CD4(+) Т-клеток ex vivo или экспансионно-культивированных CD4(+) Т-клеток ex vivo, в качестве питающих клеток и клеток для посева.

CD4(+) Т-клетки могут быть линиями CD4(+)/CD1(-) Т-клеток.

Линии CD4(+)/CD1(-) Т-клеток могут быть линиями клеток H9 или HuT78.

Клетки для посева могут быть одной или более клетками, выбранными из группы, состоящей из клеток, полученных из периферической крови, лейкоцитов периферической крови, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), лейкоцитов пуповинной крови, мононуклеарных клеток пуповинной крови, естественных клеток-киллеров, полученных из стволовых клеток, обогащенных естественных клеток-киллеров и выделенных естественных клеток-киллеров.

Кроме того, фармацевтическая комбинация может дополнительно содержать альбумин.

Злокачественное новообразование может быть по меньшей мере однимзлокачественным новообразованием, выбранным из группы, состоящей из злокачественного новообразования желудка, злокачественного новообразования печени, злокачественного новообразования легкого, колоректального злокачественного новообразования, злокачественного новообразования молочной железы, злокачественного новообразования простаты, злокачественного новообразования яичников, злокачественного новообразования поджелудочной железы, злокачественного новообразования шейки матки, злокачественного новообразования щитовидной железы, злокачественного новообразования гортани, острого лимфобластного лейкоза, опухоли головного мозга, нейробластомы, ретинобластомы, злокачественного новообразования головы и шеи, злокачественного новообразования слюнных желез и лимфомы.

Лимфома может быть злокачественной опухолью В-клеточного происхождения.

Злокачественная опухоль В-клеточного происхождения может быть по меньшей мере злокачественной опухолью В-клеточного происхождения, выбранной из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

Антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки могут вводится отдельно.

Антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки могут вводиться одновременно.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения может предложить набор для лечения злокачественного новообразования, содержащий описанную выше комбинацию.

Еще один вариант осуществления настоящего изобретения может предложить применение описанной выше фармацевтической комбинации для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Кроме того, еще один вариант осуществления настоящего изобретения может предложить способ лечения злокачественного новообразования, включающий стадию введения субъекту вышеуказанного антитела, специфичного к CD19, и вышеуказанных NK-клеток в комбинации.

Положительные эффекты изобретения

Фармацевтическая комбинация, содержащая антитело, специфичное к CD19, и естественные клетки-киллеры, согласно варианту осуществления настоящего изобретения, полезна для лечения злокачественного новообразования, в частности, В-клеточной злокачественной опухоли, такой как неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз и/или острый лимфоцитарный лейкоз. В частности, естественные клетки-киллеры получают клинически безопасным способом по сравнению с традиционными способами, так что они обладают высокой эффективностью в отношении уничтожения клеток, выживаемостью клеток и пригодны для долгосрочного хранения, а также способны проявлять синергетические эффекты при лечении опухоли в случае введения в комбинации с определенным антителом, специфичным к CD19.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1a-1d продемонстрированы результаты, полученные при культивировании В-клеточных лимфом Беркитта, Raji и Ramos, с различными концентрациями моноклональных антител в присутствии NK-клеток.

На Фиг. 2 продемонстрированы результаты, полученные при оценке пригодности клеточных линий Ramos в модели у мышей SCID.

На Фиг. 3 продемонстрированы результаты, полученные при введении MOR208 в различных концентрациях в группе модели у мышей SCID, которым внутривенно вводили клетки Ramos.

На Фиг. 4 продемонстрированы результаты, полученные при введении MG4101 в различных концентрациях в группе модели у мышей SCID, которым внутривенно вводили клетки Ramos.

На Фиг. 5 продемонстрированы результаты, полученные при введении контроля, MOR208, MG4101 и «MOR208/MG4101» в группе модели у мышей SCID, которым внутривенно вводили клетки Ramos.

Описание вариантов осуществления

Несмотря на возможность того, что естественные клетки-киллеры могут

применяться в качестве лекарственных средств при различных заболеваниях, доступ к ним затруднен из-за ряда ограничений, таких как довольно ограниченное количество естественных клеток-киллеров в периферической крови, трудности, связанные с надлежащей производственной практикой (НПП) соответствующей крупномасштабному производству цитолитических естественных клеток-киллеров и естественных клеток-киллеров, которые необходимо активировать, чтобы стимулировать опосредованное естественными клетками-киллерами уничтожение.

Недавно авторы настоящего изобретения разработали простой и эффективный способ крупномасштабной пролиферации и активации естественных клеток-киллеров, полученных от здоровых доноров в условиях НПП (KR10-1644984 B1). Кроме того, естественные клетки-киллеры, которые были размножены ex vivo с помощью способа крупномасштабного культивирования NK-клеток из мононуклеарных клеток пуповинной крови и высокоактивированы, были получены в условиях НПП и проявили сильную противораковую активность in vitro и in vivo в доклинических исследованиях.

С другой стороны, способы лечения с использованием моноклональных антител, специфичных к молекуле эпитопа, экспрессируемой в раковых клетках, на сегодняшний день известны как наиболее успешные иммунотерапевтические способы лечения злокачественного новообразования. Одним из механизмов их действия является опосредованная естественными клетками-киллерами антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ). Поскольку естественные клетки-киллеры пролиферировали согласно варианту осуществления настоящего изобретения, они экспрессировали высокие уровни CD16, который является Fc-рецептором, который опосредует АЗКЦ, авторы настоящего изобретения предприняли попытку проверить, может ли их противораковая активность против B-клеточной лимфомы быть усилена в присутствии антитела к CD19.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что в случае введения определенного антитела, специфичного к CD19, и естественных клеток-киллеров в комбинации, синергические эффекты проявляются in vitro и in vivo в отношении прямой гибели злокачественной B-клеточной опухоли человека через АЗКЦ, по сравнению со случаем введения лишь антитела или естественных клеток-киллеров.

Один аспект настоящего изобретения предлагает фармацевтическую комбинацию для лечения злокачественного новообразования, содержащую антитело, специфичное к CD19, и естественных клеток-киллеров.

Термин «CD19», в контексте настоящего документа, относится к белку, известному как CD19, имеющему следующие синонимы: B4, антиген B-лимфоцитов CD19, поверхностный антиген B-лимфоцитов B4, CVID3, дифференцировочный антиген CD19, MGC12802 и антиген T-клеточной поверхности Leu-12. CD19 может быть CD19, полученным от человека, а CD19 человека может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. CD19 экспрессируется клетками и тканями при различных заболеваниях и патологиях, включая большинство злокачественных B-клеточных опухолей, а также на нормальных B-клетках.

Кроме того, в контексте настоящего документа, термин «антитело» относится к моноклональному антителу, включая любой изотип, такой как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Антитело IgG состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей, связанных дисульфидными связями. Каждая из тяжелых цепей и легких цепей содержит константную область и вариабельную область. Каждая вариабельная область содержит три сегмента, называемых «определяющими комплементарность областями (CDR)» или «гипервариабельными областями», которые в первую очередь отвечают за связывание с эпитопом антигена. Они имеют последовательную нумерацию от N-конца и обозначаются как CDR1, CDR2 и CDR3. Более высококонсервативная часть вне CDR в вариабельной области называется «каркасной областью».

То есть антитело к CD19 представляет собой антитело, которое специфически связывается с антигеном CD19 и может содержать не только полную форму антитела, но также его антигенсвязывающий фрагмент.

Примеры антител, специфичных к CD19, согласно варианту осуществления настоящего изобретения могут включать антитела, описанные в US12/377251 (Xencor); WO 2005/012493, WO 2010/053716 (Immunomedics); WO 2007/002223 (Medarex); WO 2008/022152 (Xencor); WO 2008/031056 (Medimmune); WO 2007/076950 (Merck Patent GmbH); WO 2009/052431 (Seattle Genetics); и WO 2010/095031 (Glenmark Pharmaceuticals).

Кроме того, антитело, специфичное к CD19, согласно варианту осуществления настоящего изобретения, может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2) и область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3). Кроме того, антитело, специфичное к CD19, по настоящему изобретению, может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую область LCDR1 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

Антитело, специфичное к CD19, согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, может включать антитело, которое перекрестно конкурирует с антителом настоящего изобретения, как описано выше.

Термин «перекрестная конкуренция», в контексте настоящего документа, означает способность антитела или другого связывающего агента препятствовать связыванию другого антитела или связывающего агента с CD19 в стандартном анализе конкурентного связывания. Способность или степень, в которой антитело или другой связывающий агент способны препятствовать связыванию другого антитела или связывающего агента с CD19, и, таким образом, может ли это называться перекрестной конкуренцией согласно настоящему изобретению, можно определить с помощью стандартного анализа конкурентного связывания.

Кроме того, антитело, специфичное к CD19, согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения, может включать антитело, связывающееся с тем же эпитопом, что и антитело по настоящему изобретению, как описано выше.

Кроме того, антитело может содержать вариабельную область тяжелой цепи EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 8) и вариабельную область легкой цепи DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNL NSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 9). Кроме того, антитело может содержать константную область тяжелой цепи ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10). Кроме того, антитело может содержать константную область легкой цепи RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11). Вышеописанное антитело к CD19 может быть «MOR208». Антитело MOR208 может быть антителом, раскрытым в заявке на патент США № 12/377251.

В контексте настоящего документа термин «естественные клетки-киллеры (далее именуемые NK-клетками)» относится к цитотоксическим лимфоцитам, которые играют важную роль в иммунной системе организма. Для целей настоящего изобретения NK-клетки могут быть эндогенными NK-клетками субъекта и/или экзогенными NK-клетками, в частности выделенными NK-клетками, которые вводят экстрапорально субъекту, но не ограничиваясь этим. Кроме того, NK-клетки могут быть получены путем покупки коммерчески доступного продукта или в соответствии с обычными методами, такими как выделение из субъекта или культуры.

С другой стороны, NK-клетки, содержащиеся в фармацевтической комбинации согласно варианту осуществления настоящего изобретения, могут быть получены путем стимуляции мононуклеарных клеток, из которых были удалены Т-клетки, антителами к CD3 и питающими клетками в среде, содержащей цитокины, проведения стационарного культивирования в течение нескольких дней для стимуляции межклеточных контактов и выполнения стационарного или суспензионного культивирования NK-клеток при постоянном поддержании концентрации клеток и концентрации цитокинов.

Для того, чтобы получить увеличенное количество NK-клеток, стимуляцию и стационарное культивирование можно повторить перед последующим стационарным или суспензионным культивированием. NK-клетки, полученные с помощью способа по настоящему изобретению, можно культивировать ex vivo с высокой эффективностью и высокой концентрацией, демонстрируя при этом высокую выживаемость клеток и эффективность в отношении уничтожения клеток, и, таким образом, они могут быть введены в комбинации с антителом к CD19 для лечения злокачественной опухоли В-

клеточного происхождения.

В качестве примера, NK-клетки могут быть получены с помощью способа, включающего следующие стадии (i)-(iii).

Стадию (i) проведения стационарного культивирования выделенных NK-клеток в культуральной среде, содержащей антитела к CD3, цитокины и питающие клетки, для стимуляции межклеточных контактов;

стадию (ii) добавления цитокинов, антител к CD3 и питающих клеток в среду для повторной стимуляции и повторного проведения стационарного культивирования для индукции межклеточных контактов; и

стадию (iii) добавления среды, содержащей цитокины, к клеткам и проведения стационарного или суспензионного культивирования при постоянном поддержании концентрации клеток и концентрации цитокинов.

При этом выделенные NK-клетки могут быть получены путем выделения лейкоцитов и NK-клеток из периферической крови человека или пуповинной крови.

При этом стационарное культивирование после начальной стимуляции можно проводить в течение около 2-15 дней, в частности, в течение 5-10 дней, а стационарное культивирование после повторной стимуляции можно проводить в течение около 2-7 дней, в частности, в течение 3-5 дней. Кроме того, после завершения стационарного культивирования, стационарное или суспензионное культивирование может быть выполнено в инкубаторе, при постоянном поддержании концентрации цитокинов. Кроме того, в случае получения NK-клеток при добавлении альбумина к композиции, содержащей NK-клетки, эффективность в отношении уничтожения клеток и клеточная выживаемость NK-клеток могут быть значительно увеличены. В частности, NK-клетки, полученные с помощью описанного выше способа, могут быть обозначены как «MG4101». Способ получения NK-клеток согласно варианту осуществления настоящего изобретения и NK-клетки могут быть такими, которые описаны в патенте Кореи № 10-1644984.

В контексте настоящего документа термин «питающие клетки (также называемые клетки, способствующие культивированию)» относятся к клеткам, которые не имеют способности пролиферировать путем деления, но обладают метаболической активностью, тем самым продуцируя различные метаболиты, способствующие пролиферации целевых NK-клеток. В качестве питающих клеток, которые могут быть использованы, могут быть использованы линии животных клеток, в которые были введены гены, лейкоциты периферической крови (ЛПК), обработанные различными цитокинами или соединениями, собственные или чужеродные лейкоциты периферической крови (ЛПК), Т-клетки, В-клетки, или моноциты, и т.п., и, в частности, могут быть использованы собственные мононуклеарные клетки периферической крови, но не ограничиваясь этим.

Кроме того, собственные мононуклеарные клетки периферической крови, используемые в качестве питающих клеток, могут быть инактивированы для обеспечения безопасности. В качестве способа инактивации может быть использован обычный способ,

известный в данной области техники, и, например, может быть использован способ облучения гамма-лучами. Такие инактивированные питающие клетки включают выделенные Т-клетки. Способ пролиферации с использованием питающих клеток, как описано выше, представляет собой способ пролиферации NK-клеток после их чистого выделения и имеет преимущество, заключающееся в том, что впоследствии непрерывно пролиферируют только чистые NK-клетки.

В контексте настоящего документа, термин «антитело к CD3» относится к антителу, которое специфически связывается с антигеном CD3, который представляет собой группу молекул, которая связывается с Т-клеточным рецептором (TCR) с образованием комплекса распознавания антигена. Молекула CD3 связывается с TCR и служит для передачи сигнала распознавания антигена в клетку. Антитело к CD3, используемое в настоящем изобретении, не ограничено, если оно представляет собой антитело, обладающее свойствами связывания с CD3. Например, антитело к CD3 может быть выбрано из группы, состоящей из OKT3, UCHT1 и HIT3a, но не ограничиваясь этим.

В настоящем изобретении цитокины, которые могут содержаться в среде, могут быть одним или более цитокинами, выбранными из интерлейкинов. Например, могут быть применены один или более интерлейкинов, выбранных из группы, состоящей из интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-12 (IL-12), интерлейкина-15 (IL-15), интерлейкина-18 (IL-18) и интерлейкина-21 (IL-21), но не ограничиваясь этим.

Кроме того, концентрация антитела к CD3 в среде, которая используется для стационарного культивирования и суспензионного культивирования, может составлять от 0,1 до 1000 нг/мл, от 1 до 100 нг/мл или от 5 до 20 нг/мл, а концентрация цитокинов в среде может составлять от 10 до 2000 МЕ, от 100 до 1000 МЕ или около от 200 до 700 МЕ.

В контексте настоящего документа, термин «стимуляция» означает индукцию пролиферации NK-клеток путем добавления к ним питающих клеток или тому подобного, при этом антитела к CD3 могут быть использованы совместно. Кроме того, к контексте настоящего документа, термин «повторная стимуляция» означает повторную индукцию пролиферации NK-клеток путем повторного добавления питающих клеток и/или антитела к CD3 в среду по истечении определенного времени культивирования.

В качестве среды для культивирования NK-клеток согласно варианту осуществления настоящего изобретения может быть использована обычная среда для культивирования животных клеток, такая как среда CellGro (Cellgenix), среда AIM-V, среда RPMI 1640 и X-VIVO 20.

В частности, в способе получения NK-клеток для того, чтобы постоянно поддерживать концентрацию клеток и цитокинов во время суспензионного культивирования, концентрация цитокинов и клеток в среде может быть измерена через определенные интервалы времени и, в зависимости от измеренных значений, может быть предоставлена среда, содержащая цитокины, чтобы соответствовать концентрации клеток и цитокинов.

Кроме того, культивирование может быть выполнено путем добавления к среде

сыворотки или плазмы, и дополнительного фактора пролиферации, который поддерживает пролиферацию лимфоцитов. Типы добавляемой в среду сыворотки или плазмы особо не ограничиваются. Может быть использована любая коммерчески доступная сыворотка или плазма животного происхождения и полученная от человека, которую получают от одного и того же человека. Например, может быть добавлена комбинация цитокинов, которые пролиферируют лимфоциты из мононуклеарных клеток периферической крови, лектинов, которые стимулируют пролиферацию лимфоцитов, и т.п.

В частности, когда альбумин добавляют к композиции, содержащей NK-клетки, полученные с помощью способа по настоящему изобретению, могут быть значительно улучшены долговременное хранение NK-клеток, их эффективность в отношении уничтожения клеток и выживаемость клеток. Количество добавляемого альбумина особо не ограничивается. Альбумин может содержаться, в частности, в диапазоне от 0,1% до 5% по массе и, более конкретно, в диапазоне от 0,5% до 2% по массе во всей композиции.

Кроме того, применяя способ культивирования, в котором постоянно поддерживается концентрация клеток для получения NK-клеток, можно предотвратить чрезмерный рост клеток, тем самым поддерживая клетки в оптимальном состоянии. В частности, даже в случае размораживания после замораживания клетки не имеют нарушенной функции и могут поддерживать высокую выживаемость клеток и эффективность в отношении уничтожения клеток. Следовательно, существует преимущество, заключающееся в том, что хранение и поставка легко осуществляются в жидкой или замороженной форме хранения без дополнительной обработки.

С другой стороны, NK-клетки, используемые в настоящем изобретении, могут быть, например, клетками, полученными способом, включающим стадию совместного культивирования CD4(+) Т-клеток, которые были выделены ex vivo или CD4(+) Т клеток, которые были экспансионно-культивированы ex vivo, в качестве питающих клеток и клеток для посева.

В частности, CD4(+) Т-клетки, используемые в настоящем изобретении, могут быть линиями CD4(+)/CD1(-) Т-клеток и, более конкретно, могут быть линиями клеток H9 или HuT78.

В контексте настоящего документа, термин «клетки для посева» означает клетки в качестве исходного материала для получения клетки-мишени. Клетки для посева, используемые в настоящем изобретении, могут быть, без ограничения, одной или более клетками для посева, выбранными из группы, состоящей из клеток периферической крови, лейкоцитов периферической крови, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), лейкоцитов пуповинной крови, лейкоцитов пуповинной крови, мононуклеарных клеток пуповинной крови, естественных клеток-киллеров, полученных из стволовых клеток, обогащенных естественных клеток-киллеров и выделенных естественных клеток-киллеров.

Что касается способа получения NK-клеток согласно варианту осуществления

настоящего изобретения и NK-клеток, они могут быть теми, которые описаны в патентах Кореи №№ 10-1697473 или 10-1799986.

Такой способ получения NK-клеток способен не только селективно вызывать пролиферирацию только NK-клеток в большом масштабе из небольшого количества клеток для посева, но также позволяет поддерживать их высокую эффективность уничтожения. Следовательно, благодаря содержанию NK-клеток, полученных таким способом, которые, таким образом, имеют высокую выживаемость клеток и эффективность в отношении уничтожения клеток, а также наличие определенного антитела к CD19, фармацевтическая комбинация согласно варианту осуществления настоящего изобретения проявляет весьма превосходные терапевтические эффекты против злокачественного новообразования.

Кроме того, в контексте настоящего документа, термин «комбинация» означает композицию, в которой объединены более одного эффективного ингредиента, например, эффективные ингредиенты, такие как антитело и естественные клетки-киллеры. Соответствующие эффективные ингредиенты, содержащиеся в комбинации по настоящему изобретению, могут быть введены субъекту одновременно или по отдельности в разное время. Таким образом, соответствующие эффективные ингредиенты не обязательно должны присутствовать в комбинации в виде одной композиции во время введения. Комбинация согласно настоящему изобретению относится к комбинации, лекарственному средству и фармацевтической композиции. В вариантах осуществления настоящего изобретения компоненты комбинации вводятся в то время, когда оба компонента (лекарственные средства) активны у пациента одновременно. Под «синергизмом» подразумевается, что оба лекарственных средства действуют у пациента одновременно. В вариантах осуществления настоящего изобретения компоненты комбинации вводят вместе, одновременно, по отдельности или последовательно, либо физически, либо по времени. В вариантах осуществления настоящего изобретения компоненты комбинации вводят одновременно.

Фармацевтическая комбинация применима ко всем типам опухолей, включая злокачественные солидные новообразования и злокачественные новообразования крови. В отличие от злокачественного новообразования крови, злокачественные солидные новообразования относятся к злокачественному новообразованию, образовавшемуся в уплотнении в органах. Злокачественные новообразования, развивающиеся в большинстве органов, соответствуют злокачественным солидным новообразованиям. Нет особых ограничений в отношении опухолей, которые можно лечить с помощью фармацевтической комбинации согласно настоящему изобретению. Фармацевтическая комбинация в соответствии с настоящим изобретением может оказывать синергетический терапевтический эффект, например, по меньшей мере на одно заболевание, выбранное из группы, состоящей из злокачественного новообразования желудка, злокачественного новообразования печени, злокачественного новообразования легкого, колоректального злокачественного новообразования, злокачественного новообразования молочной железы,

злокачественного новообразования простаты, злокачественного новообразования яичников, злокачественного новообразования поджелудочной железы, злокачественного новообразования шейки матки, злокачественного новообразования щитовидной железы, злокачественного новообразования гортани, острого миелоидного лейкоза, опухоли головного мозга, нейробластомы, ретинобластомы, злокачественного новообразования головы и шеи, злокачественного новообразования слюнных желез и лимфомы.

Термины «синергизм», «синергетический эффект» и «синергетическое действие», в контексте настоящего документа, означают выход за пределы аддитивного эффекта комбинации, который ожидается от комбинации.

Кроме того, лимфома может быть, в частности, злокачественной опухолью В-клеточного происхождения, которая может быть по меньшей мере опухолью, выбранной из группы, состоящей из неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и острого лимфобластного лейкоза.

Неходжкинская лимфома может быть лимфомой, выбранной из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой, лимфомы маргинальной зоны, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы.

Два компонента синергической комбинации по настоящему изобретению, например, антитело, специфичное к CD19, и NK-клетка, могут быть введены согласованным, одновременным, раздельным или последовательным образом с физической или временной точки зрения. Термин «введенный» или «введение», в контексте настоящего документа, предназначен для охвата, но не ограничиваясь этим, доставки с помощью инъекционной формы, например, с помощью внутривенного, внутримышечного, внутрикожного или подкожного пути введения, или через слизистую оболочку, например, в виде назального спрея или аэрозоля для ингаляции, или в виде раствора, капсулы или таблетки для приема внутрь. Кроме того, фармацевтическая комбинация может быть введена в комбинации с другим лекарственным средством или физиологически активным веществом, терапевтические эффекты которого известны для заболевания, которое подлежит лечению, или может быть составлена в форме комбинированного препарата с другим лекарственным средством.

Например, NK-клетки могут быть введены до и/или отдельно с введением антитела, специфичного к CD19, примером которого является MOR208. В случае, когда два компонента вводят вместе, эти компоненты могут быть объединены в одну фармацевтическую композицию, которая может содержать фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. Альтернативно, два компонента также могут быть включены в различные фармацевтические композиции. В этом случае два компонента могут быть введены одновременно или отдельно. В частности, в случае введения антитела, специфичного к CD19, и NK-клеток, эти компоненты могут быть одновременно активными в организме пациента, в который их ввели. Например, в случае, когда MOR208 вводится еженедельно, а NK-клетки вводятся ежедневно, у пациента

одновременно присутствуют активные ингредиенты обоих лекарственных средств.

Кроме того, в другом аспекте настоящего изобретения предлагается набор для лечения злокачественного новообразования, содержащий описанную выше комбинацию. Типы набора особо не ограничиваются, и может быть использован тип набора, обычно используемый в данной области техники.

Набор может быть упакован в форме, в которой антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки, как описано выше, содержатся в отдельных контейнерах, соответственно, или в форме, в которой антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки, как описано выше, содержатся в одном контейнере, который разделен на одно или более отделений. Каждое из антитела, специфичного к CD19, и NK-клеток, могут быть упакованными в стандартной одноразовой дозе, но не ограничиваясь этим. Антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки в наборе могут быть введены в комбинации, по отдельности в подходящее время, в зависимости от состояния здоровья или т.п. субъекта, которому вводят комбинацию.

Другой аспект настоящего изобретения предлагает применение описанной выше фармацевтической комбинации для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования. Кроме того, предложено применение описанной выше фармацевтической комбинации для лечения злокачественных новообразований и подобных патологий.

Кроме того, еще один аспект настоящего изобретения предлагает способ лечения злокачественного новообразования, включающий стадию (a) получения NK-клетки, стадию (b) получения антитела, специфичного к CD19, содержащего область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6) и стадию (c) введения субъекту терапевтически эффективных количеств антитела, специфичного к CD19 и NK-клетке в комбинации.

Используемый в данном документе термин «субъект» означает млекопитающее, включая человека, имеющее злокачественное новообразование в патологическом состоянии, которое можно облегчить, подавить или вылечить путем введения антитела, специфичного к CD19 и NK-клеток, в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения или страдающего таким заболеванием. Кроме того, субъект может быть животным, отличным от человека, и термин «животное, отличное от человека» включает позвоночных, таких как млекопитающие и отличных от млекопитающих животных, например, приматов, кроме людей, овец, собак, кошек, лошадей, коров, кур, амфибии, рептилии и др.

Можно предложить способ лечения злокачественного новообразования, включающий стадию (a) получения NK-клеток, стадию (b) получения антитела, специфичного к CD19, и стадию (c) терапевтического введения субъекту эффективных количеств антитела, специфичного к CD19 и NK-клеток в комбинации.

Поскольку стадия (a) получения NK-клеток и антитела, специфичного к CD19 на стадии (b), уже были описаны выше, их описания опущены во избежание повторения.

Стадия (c) введения может быть осуществлена путем введения антитела, специфичного к CD19, и NK-клеток в комбинации, в одновременном, последовательном или обратном порядке.

Аспект настоящего раскрытия включает синергетическую комбинацию антитела, специфичного к CD19, содержащего область HCDR1 последовательности SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 последовательности NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3 последовательности GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1 последовательности RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 последовательности RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 последовательности MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6) и NK-клетки для лечения неходжкинской лимфомы, хронического лимфолейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой, лимфомы маргинальной зоны, диффузной B-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения NK-клетки представляют собой MG4101.

Аспект настоящего раскрытия включает антитело, специфичное к CD19, содержащее область HCDR1 последовательности SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 последовательности NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3 последовательности GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1 последовательности RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 последовательности RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 последовательности MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6) для лечения неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза, причем указанное антитело, специфичное к CD19, используется в комбинации с NK-клетками. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома выбрана из группы, состоящей из фолликулярной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, лимфоидной ткани, связанной со слизистой оболочкой, лимфомы маргинальной зоны, диффузной B-крупноклеточной лимфомы, лимфомы Беркитта и мантийноклеточной лимфомы. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения NK-клетки представляют собой MG4101. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой фолликулярную лимфому. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой лимфоидную ткань, связанную со слизистой оболочкой. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой лимфому маргинальной зоны. В вариантах

осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой диффузную В-крупноклеточную лимфому. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой лимфому Беркитта. В вариантах осуществления настоящего изобретения неходжкинская лимфома представляет собой мантийноклеточную лимфому.

Другой аспект включает в себя способ лечения неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза у индивидуума, нуждающегося в этом, который включает введение антитела, специфичного к CD19 в комбинации с NK-клетками. В вариантах осуществления способа антитело, специфичное к CD19, содержит область HCDR1 последовательности SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 последовательности NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3 последовательности GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1 последовательности RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 последовательности RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 последовательности MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6). В вариантах осуществления способа антитело включает приведенное в качестве примера антитело, специфичное к CD19. В вариантах осуществления способа NK клетки представляют собой MG4101.

Другой аспект включает использование антитела, специфичного к CD19, причем указанное антитело содержит область HCDR1 последовательности SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 последовательности NPYNDG (SEQ ID NO: 2), область HCDR3 последовательности GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3), область LCDR1 последовательности RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 последовательности RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 последовательности MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6), при производстве лекарственного средства для лечения неходжкинской лимфомы, хронического лимфоцитарного лейкоза и/или острого лимфобластного лейкоза в синергической комбинации с NK-клетками. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения NK-клетки представляют собой MG4101.

Кроме того, путь введения, дозировка и частота введения антител, специфичных для CD19, и NK-клеток может изменяться в зависимости от состояния пациента и наличия или отсутствия побочных эффектов, и, таким образом, введение субъекту может быть проведено различными способами и в различных количествах. Оптимальный способ введения, дозировки и частота введения могут быть выбраны специалистом в данной области техники в пределах соответствующих диапазонов.

Антитело, специфическое к CD19, и NK-клетки можно вводить парентерально, и введение можно проводить любым способом, подходящим для внутриопухолевого, внутрибрюшинного, подкожного, внутрикожного, интранодального и внутривенного путей и т.п. В частности, антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки, можно вводить внутриопухолево, внутрибрюшинно или внутривенно. С другой стороны, дозировки антитела, специфичного к CD19, и NK-клетки может быть определена в зависимости от

графика введения, дозировки, и состояния здоровья пациента.

Кроме того, NK-клетки могут быть введены от двух до пяти раз, и могут быть введены субъекту с интервалом от 1 до 30 дней, от 2 до 15 дней, или от 3 до 10 дней.

Антитело, специфичное к CD19, можно вводить в течение 2-48 часов после введения NK-клеток. В частности, антитело, специфичное к CD19, можно вводить непрерывно в течение 3-5 дней до введения NK-клеток и в течение 9-11 дней один раз в день, начиная с 2 часов после введения NK-клеток. Подробности, относящиеся к злокачественному новообразованию, которое является целевым заболеванием, при котором проявляются синергические терапевтические эффекты за счет вышеупомянутого комбинированного введения, описаны в фармацевтической комбинации.

Другой аспект настоящего изобретения предлагает применение антитела, специфичного к CD19, использованного в фармацевтической комбинации с естественной клеткой-киллером для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Так как антитела, специфичные к CD19, естественные клетки-киллеры и их комбинированное введение, используемые в настоящем изобретении, уже описаны выше, их описания опущены во избежание повторения.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с помощью следующих примеров. В данном документе авторы настоящего изобретения намерены описать синергетические эффекты комбинированного введения антитела к CD19 и естественных клеток-киллеров. Однако следующие примеры даны только для иллюстрации настоящего изобретения, и объем настоящего изобретения не ограничивается только ими.

Таблица 1: Последовательности

Антитело		**SEQ ID NO:**	**[аминокислота]/ДНК**
MOR208	HCDR1	SEQ ID NO:1	SYVMH
	HCDR2	SEQ ID NO:2	NPYNDG
	HCDR3	SEQ ID NO:3	GTYYYGTRVFDY
	LCDR1	SEQ ID NO:4	RSSKSLQNVNGNTYLY
	LCDR2	SEQ ID NO:5	RMSNLNS
	LCDR3	SEQ ID NO:6	MQHLEYPIT
	VH	SEQ ID NO:8	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGY TFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPY NDGTKYNEKFQGRVTISSDKSISTAYME LSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFD

			YWGQGTLVTVSS
	VL	SEQ ID NO:9	DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSL QNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRM SNLNSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPE DFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK
	Константная область тяжелой цепи	SEQ ID NO:10	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTIS KTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
	Константная область легкой цепи	SEQ ID NO:11	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
CD19	CD19 человека	SEQ ID NO:7	MPPPRLLFFLLFLTPMEVRPEEPLVVKVE EGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIF NVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGW TVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKN RSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEI WEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGS TLWLSCGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKG PKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLL PRATAQDAGKYYCHRGNLTMSFHLEIT ARPVLWHWLLRTGGWKVSAVTLAYLIF

			CLCSLVGILHLQRALVLRRKRKRMTDPT RRFFKVTPPPGSGPQNQYGNVLSLPTPTS GLGRAQRWAAGLGGTAPSYGNPSSDVQ ADGALGSRSPPGVGPEEEEGEGYEEPDS EEDSEFYENDSNLGQDQLSQDGSGYENP EDEPLGPEDEDSFSNAESYENEDEELTQP VARTMDFLSPHGSAWDPSREATSLGSQS YEDMRGILYAAPQLRSIRGQPGPNHEED ADSYENMDNPDGPDPAWGGGGRMGT WSTR

Пример получения 1. Клеточные линии, первичные клетки и условия культивирования

Клеточные линии Raji и Ramos (линии клеток лимфомы Беркитта человека) были получены от Американской коллекции типовых культур (ATCC, США). Клеточные линии Raj и Ramos поддерживали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 2 ммоль/л глутамина. Что касается NK-клеток, мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) были выделены случайным образом от здоровых доноров, и NK-клетки были экспансионно-культивированы в условиях надлежащей производственной практики (НПП) способом, описанным выше (MG4101, Green Cross Labcell Corporation). Вкратце, МКПК, в которых CD3+ Т-клетки были почти полностью удалены, культивировали для экспансии в бессывороточной среде CellGro SCGM (Cellgenix), содержащей 1% аутоплазмы, 5×10^6клеток/мл аутологичных МКПК, облученных радиацией (2000 рад), 10 нг/мл моноклональных антител к CD3 (OKT3, eBioscience) и 500 МЕ/мл IL2 (пролейкин). 500 МЕ/мл IL2 добавляли в среду каждые 2-3 дня во время культивирования NK-клеток.

Пример получения 2. Моноклональные антитела

MOR208, антитело, специфичное к CD19, получали от MorphoSys AG (Германия). Ритуксимаб (антитело к CD20) приобретали у Roche. Уровень экспрессии антигена, определенный как количество антитела MOR208 или ритуксимабама, связанных с клеткой, определяли с помощью проточной цитометрии (набор Quantibrite, BD Biosciences) в соответствии с инструкциями производителя. Количество сайтов связывания MOR208 на клетку Raji и Ramos составляло 56702 и 27772, соответственно. Количество сайтов связывания ритуксимаба на клетку Raji и Ramos составляло 59974 и 168253, соответственно.

Пример получения 3. Анализ цитотоксичности с высвобождением кальцеина

Клетки - мишени метили 30 мкМ кальцеин-ацетоксиметил эфира (кальцеин-AM; Molecular Probes) при 37°C в течение 1 часа. После промывания меченые клетки-мишени помещали в 96-луночный планшет из расчета 1×10^4 клеток на лунку. Моноклональные

антитела (MOR208, ритуксимаб или контрольное нерелевантное антитело) добавляли к клеткам-мишеням (при концентрации между 0,001 нг/мл и 10 мкг/мл). MG4101 собирали, промывали и добавляли к клеткам-мишеням в соотношении 3:1 (E/T). Через 2 часа планшет вращали при 2000 об/мин в течение 3 минут и собирали 100 мкл супернатанта. Затем значение флуоресценции (OD480/535 нм) измеряли с использованием флуоресцентного ридера для микропланшетов (Victor3, Perkin Elmer), чтобы определить количество высвобожденного кальцеина. Конкретное количество высвобожденного кальцеина рассчитывали с использованием следующего уравнения:

Специфическое растворение% = (Высвобождение в анализе - Самопроизвольное высвобождение) × 100/(Максимальное высвобождение - Самопроизвольное высвобождение)

Максимальное растворение было достигнуто с 1% Тритон X-100.

Пример получения 4. Модель опухоли у мыши

Пример получения 4.1. Создание модели ксенотрансплантата Ramos у мышей SCID

Клетки Ramos (1×10^5, 5×10^5 или 10×10^5 на мышь) суспендировали в ФСБ и внутривенно вводили мышам SCID. За животными ежедневно наблюдали на предмет признаков болезни, паралича задних конечностей или смерти.

Пример получения 4.2. Тестирование доз MOR208 в модели ксенотрансплантата Ramos

Клетки Ramos (1×10^6 на мышь) суспендировали в ФСБ и внутривенно вводили мышам SCID (день 0). MOR208 внутривенно вводили в различных концентрациях (20, 60 или 200 мкг/100 мкл/ на животное) на 3, 6, 10, 13, 17 и 20 дни. За животными ежедневно наблюдали на предмет признаков болезни, паралича задних конечностей или смерти.

Пример получения 4.3. Тестирование доз MG4101 в модели ксенотрансплантата Ramos

Клетки Ramos (1×10^6 на мышь) суспендировали в ФСБ и внутривенно вводили мышам SCID (день 0). MG4101 внутривенно вводили в различных концентрациях (1, 2 или 5×10^7/400 мкл/ на животное) на 4, 7, 11, 14, 18 и 21 дни. За животными ежедневно наблюдали на предмет признаков болезни, паралича задних конечностей или смерти.

Пример получения 4.4. Тест эффективности MG4101+MOR208 в модели ксенотрансплантата Ramos

Клетки Ramos (1×10^6 на мышь) суспендировали в ФСБ и внутривенно вводили мышам SCID (день 0). Мышей разделяли на 6 групп и скорректировали следующим образом:

i) замороженная среда и внутривенная инъекция hIgG (200 мкг)

ii) внутривенная инъекция MG4101(2×10^7/400 мкл/ на животное)

iii) внутривенная инъекция MOR208 (60 мкг/ на животное)

iv) внутривенная инъекция MOR208 (200 мкг/ на животное)

v) внутривенная инъекция MG4101 (2×10^7/400 мкл/ на животное) и внутривенная

инъекция MOR208 (60 мкг/ на животное)

vi) внутривенная инъекция MG4101 (2×10^7/400 мкл/ на животное) и внутривенная инъекция MOR208 (200 мкг/ на животное).

Эти введения проводили путем внутривенных инъекций два раза в неделю в течение 3 недель с hIgG или MOR208 в различных концентрациях (60 или 200 мкг/100 мкл/на животное) на 3, 6, 10, 13, 17 и 20 дни.

Внутривенную инъекцию MG4101 (при концентрации 2×10^7/400 мкл/на животное) проводили на 4, 7, 11, 14, 18 и 21 дни. За животными ежедневно наблюдали на предмет признаков болезни, паралича задних конечностей или смерти.

Экспериментальный пример 1. Подтверждение сильной АЗКЦ активности in vitro MOR208 против злокачественных В-клеток

Поскольку АЗКЦ, опосредованная NK-клетками, очень важна для активности моноклональных антител, авторы настоящего изобретения сначала определили АЗКЦ активность MOR208 (антитела к CD19) и MG4101 (NK-клетки) в Raji и Ramos, которые являются клеточными линиями лимфомы Беркитта, по сравнению с ритуксимабом, который представляет собой стандартное моноклональное антитело для лечения лимфомы и используется в качестве положительного контроля и эталонного значения в настоящем изобретении.

Сначала клеточные линии Raji и Ramos (лимфомы Беркитта, CD19+ CD20+) культивировали в течение 2 часов с возрастающими концентрациями MOR208 или ритуксимаба в присутствии активированных и размноженных жидких и замороженных MG4101, полученных от трех здоровых доноров (соотношение E/T: 3:1).

Конкретную АЗКЦ (%) рассчитывали по следующему уравнению, и результаты показаны на Фиг. 1 (на которой графики показывают среднее значение АЗКЦ (%) ± СО 3 экспериментальных значений, полученных от одного представителя донора NK-клеток, у двух разных доноров).

(Высвобождение образца - Самопроизвольное высвобождение)/(Максимальное высвобождение - Самопроизвольное высвобождение) x100.

Как представлено на Фиг. 1a-1d, MOR208 проявляло замечательную in vitro АЗКЦ активность против клеточных линий Raji и Ramos. По сравнению с контролем, совместно обработанным hIgG, и MOR208, и ритуксимаб показали дозозависимую эффективность против обеих линий опухолевых клеток с активностью уже при низких концентрациях антител и повышенным максимальным лизисом опухолевых клеток. Принимая во внимание, что MOR208 и ритуксимаб показали сопоставимую максимальную эффективность уничтожения, а также значительно более высокие уровни CD20 по сравнению с CD19 (материал и способы), было продемонстрировано, что MOR208 имеет в целом более низкое значение EC_{50} по сравнению с ритуксимабом в различных злокачественных В-клетках, которые включают клетки Raji и Ramos. Это указывает на то, что MOR208 может быть интересным альтернативным терапевтическим средством в условиях, когда ритуксимаб проявляет слабые эффекты.

Экспериментальный пример 2. Влияние MOR208 на гибель клеток лимфомы у мышей SCID с ксенотрансплантатом

Экспериментальный пример 2.1. Создание модели ксенотрансплантата Ramos у мышей SCID

Что касается MOR208 in vivo экспериментов, модель ксенотрансплантата у мышей SCID, была создана с использованием клеток Ramos, чтобы оценить пригодность клеточных линий Ramos. В группах из 6 мышей SCID внутривенно вводили $1X10^5$, $5X10^5$, $10X10^5$ клеток Ramos или ФСБ и контролировать признаки болезни ежедневно. Все мыши погибли в период с 26 по 37 день после инъекции клеток Ramos.

Ссылаясь на Фиг. 2, внутривенные инъекции с различными концентрациями клеток Ramos показали онкогенную активность у мышей, которая характеризуется симптомами, включая прогрессирующую потерю массы тела и паралич задних конечностей, и почти 100% мышей погибли между 26 днем и 37 днем после инъекции. Для последующих экспериментов была выбрана оптимальная доза клеток линии Ramos равная 1×10^6 клеток.

Экспериментальный пример 2.2. Тестирование доз MOR208 в модели ксенотрансплантата Ramos

Эффективность MOR208 в отношении гибели клеток В-лимфомы клинически важна для возможности истощения первичных злокачественных В-клеток у пациентов. Авторы настоящего изобретения внутривенно вводили клетки Ramos мышам SCID и оценивали противоопухолевую активность MOR208 на модели размноженной лимфомы, в которой MOR208 вводили, как описано в «Примерах получения» выше. В этой модели диссеминированные клетки Ramos проникли во все органы мыши, включая центральную нервную систему, что отражает такие заболевания, как размноженная лимфома Беркитта и острый лимфобластный лейкоз. В связи с этим, в группах из 10 мышей SCID внутривенно вводили 1×10^6 клеток Ramos (день 0). Мышам вводили моноклональные антитела (20, 60 или 200 мг/100 мл/на животное) или hIgG (hIgG 200 мг/100 мл/на животное) в качестве отрицательного контроля на 3, 6, 10, 13, 17 и 20 дни, и ежедневно наблюдали за признаками болезни.

Как показано на Фиг. 3, введение 200 мг MOR208 значительно увеличивало выживаемость мышей ($P < 0{,}001$) по сравнению с животными, которым вводили контрольное моноклональное антитело. Средняя продолжительность выживаемости у мышей, которым вводили 200 мг MOR208, составляла 36 дней, и было установлено, что она была больше, чем у мышей, которым вводили контрольное антитело, средняя продолжительность выживаемости составляла в данном случае 28,5 дней.

Экспериментальный пример 2.3. Тестирование доз MG4101 в модели ксенотрансплантата Ramos

Мышам SCID, которым инъецировали клетки Ramos, внутривенно вводили in vitro размноженные и активированные клетки MG4101 здоровых доноров, как описано в «Примерах получения». Это добавление MG4101 клеток предназначено для имитации присутствия NK-клеток ткани, которые могут присутствовать в органе пациента. В

частности, в группах из 10 мышей SCID внутривенно вводили 1 × 10^6 клеток Ramos (день 0). Мышам вводили MG4101 (1, 2, или 5×10^7/400 мл/животное) или в качестве контроля среду для замораживания для NK-клеток на 4, 7, 11, 14, 18, и 21 дни, и наблюдали ежедневно за наличием признаков болезни.

Как показано на Фиг. 4, выживаемость мышей, которым вводили MG4101 в дозе 5 × 10^7 клеток на мышь, была значительно выше (P <0,05) по сравнению с мышами, получавшими контроль (среду для замораживания). Средняя продолжительность выживаемости у мышей, которым вводили 5 × 10^7 клеток MG4101, составляла 33 дня, а средняя продолжительность выживаемости мышей, которым вводили контрольную среду для замораживания, составляла 28 дней.

Экспериментальный пример 2.4. Подтверждение эффектов комбинированного введения MG4101+MOR208 в модели ксенотрансплантата Ramos

Мышей, которым инъецировали клетки Ramos, случайным образом делили на несколько групп и лечили двумя дозами только MOR208 или MG4101, двумя дозами комбинации MOR208 и MG4101 или средой для замораживания NK-клеток, содержащей hIgG, в качестве контроля на 3 день после инокуляции клеток Ramos, как описано в «Примерах получения». В частности, в группах из 10 мышей SCID внутривенно вводили 1 × 10^6 клеток Ramos (день 0). Мышам вводили моноклональные антитела (60 или 200 мг/100 мл/на животное) на 3, 6, 10, 13, 17 и 20 дни. Мыши внутривенно вводили MG4101 (при концентрации 2×10^7/400 мл/ на животное) на 4, 7, 11, 14, 18 и 21 дни, и контролировали ежедневно.

Как показано на Фиг. 5, было подтверждено, что мыши, которым вводили MOR208, проявляли значительно усиленные защитные эффекты по сравнению с мышами инъецированными контрольным hIgG в среде для замораживания. В группах, которым вводили MG4101, наблюдалось значительное улучшение по сравнению с контролем. Средняя продолжительность выживаемости увеличивалась до 45,5 и 38 дней для мышей, получавших 200 мг MOR208 (P <0,0001) и мышей, получавших 2X10^7 MG4101 (P <0,001), соответственно, по сравнению с 30,5 днями для мышей, получавших контроль средой для замораживания.

С другой стороны, животные, получавшие комбинацию MOR208 и MG4101, демонстрировали синергетическое увеличение выживаемости в течение периода эксперимента. В частности, средняя продолжительность выживаемости увеличивалась до 52 и 62 дней для мышей, получавших 60 мг и 200 мг MOR208, соответственно, по сравнению с исходным уровнем при совместной инъекции 2X10^7 MG4101 (P <0,0001). Существенные синергические эффекты комбинированного введения MOR208 и MG4101 также были продемонстрированы при анализе увеличения продолжительности выживаемости. В частности, каждое увеличение средней продолжительности выживаемости за счет отдельного лечения MOR208 или MG4101 составило 11,5% (60 мг MOR208), 49,2% (200 мг MOR208), и 24,6% (2×10^7 клеток MG4101), соответственно. В отличие от этого, одновременное лечение MOR208 и MG4101 показало эффекты в

отношении увеличения продолжительности выживаемости до 70,5% (60 мг MOR208) и 103,3% (200 мг MOR208), соответственно, в ситуации, когда MG4101 вводили одновременно. Эти результаты подтверждают, что по сравнению с животными, которым вводили MOR208 или MG4101 отдельно, одновременное лечение (комбинация) MG4101 и MOR208 значительно увеличивало продолжительность выживаемости у мышей, в частности, в 2 раза в случае, когда одновременно вводили 60 мг MOR208.

Другими словами, данные как in vitro, так и in vivo идентифицированные в настоящем изобретении, предполагают возможность того, что комбинация антитела к CD19 и естественных клеток-киллеров, то есть комбинированная терапия двумя компонентами, может быть эффективным лекарственным средством для лечения В-лимфомы человека, лейкоза и т.п., а также проявляет замечательные терапевтические эффекты в отношении различных злокачественных В-клеточных опухолей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая комбинация для лечения злокачественного новообразования, содержащая антитело, специфичное к CD19, и естественные клетки-киллеры (NK-клетки).

2. Фармацевтическая комбинация по п. 1,

отличающаяся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2) и область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3).

3. Фармацевтическая комбинация по п. 1,

отличающаяся тем, что антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую область LCDR1 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

4. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-3,

отличающаяся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGYTFTSYVMHWVRQAPGKGLEWIGYINPYNDGT KYNEKFQGRVTISSDKSISTAYMELSSLRSEDTAMYYCARGTYYYGTRVFDYWGQGTL VTVSS (SEQ ID NO: 8) и вариабельную область легкой цепи DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRSSKSLQNVNGNTYLYWFQQKPGQSPQLLIYRMSNL NSGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLEPEDFAVYYCMQHLEYPITFGAGTKLEIK (SEQ ID NO: 9).

5. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-4,

отличающаяся тем, что антитело содержит константную область тяжелой цепи ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPEEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10).

6. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-5,

отличающаяся тем, что антитело содержит константную область легкой цепи RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 11).

7. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-6,

отличающаяся тем, что NK-клетки получают с помощью способа, включающего следующие стадии (i) - (iii):

стадию (i) выполнения стационарного культивирования выделенных NK-клеток в культуральной среде, содержащей антитела к CD3, цитокины и питающие клетки, чтобы стимулировать межклеточные контакты;

стадию (ii) добавления цитокинов, антител к CD3 и питающих клеток в среду для повторной стимуляции и повторного проведения стационарного культивирования для индукции межклеточных контактов; и

стадию (iii) добавления среды, содержащей цитокины, к клеткам и проведения стационарного или суспензионного культивирования при постоянном поддержании концентрации клеток и концентрации цитокинов.

8. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-6,

отличающаяся тем, что NK-клетки получают с помощью способа, включающего стадию совместного культивирования выделенных CD4(+) Т-клеток ex vivo или экспансионно-культивированных CD4 (+) Т-клеток ex vivo, в качестве питающих клеток, и клеток для посева.

9. Фармацевтическая комбинация по п. 8,

отличающаяся тем, что CD4(+) Т-клетки представляют собой линии CD4(+)/CD1(-) Т-клеток.

10. Фармацевтическая комбинация по п. 9,

отличающаяся тем, что линии CD4(+)/CD1(-) Т-клеток представляют собой линии клеток H9 или HuT78.

11. Фармацевтическая комбинация по п. 8,

отличающаяся тем, что клетки для посева представляют собой одну или более клеток, выбранных из группы, состоящей из клеток, полученных из периферической крови, лейкоцитов периферической крови, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), лейкоцитов пуповинной крови, мононуклеарных клеток пуповинной крови, естественных клеток-киллеров, полученных из стволовых клеток, обогащенных естественных клеток-киллеров и выделенных естественных клеток-киллеров.

12. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-11,

отличающаяся тем, что злокачественное новообразование представляет собой по меньшей мере одно злокачественное заболевание, выбранное из группы, состоящей из злокачественного новообразования желудка, злокачественного новообразования печени, злокачественного новообразования легкого, колоректального злокачественного новообразования, злокачественного новообразования молочной железы, злокачественного новообразования простаты, злокачественного новообразования яичников, злокачественного новообразования поджелудочной железы, злокачественного новообразования шейки матки, злокачественного новообразования щитовидной железы, злокачественного новообразования гортани, острого лимфоцитарного лейкоза, опухоли головного мозга, нейробластомы, ретинобластомы, злокачественного новообразования головы и шеи, злокачественного новообразования слюнных желез, лимфомы и злокачественной опухоли В-клеточного происхождения.

13. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-12,

отличающаяся тем, что антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки вводят отдельно.

14. Фармацевтическая комбинация по любому из пп. 1-12,

отличающаяся тем, что антитело, специфичное к CD19, и NK-клетки вводят одновременно.

15. Набор для лечения злокачественного новообразования, содержащий комбинацию по любому из пп. 1-14.

16. Применение фармацевтической комбинации по любому из пп. 1-14 для получения лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

17. Применение фармацевтической комбинации по любому из пп. 1-14 для лечения злокачественного новообразования.

18. Способ лечения злокачественного новообразования, включающий стадию введения субъекту комбинации антитела, специфичного к CD19, и NK-клеток.

19. Способ по п. 18,

отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую область HCDR1 SYVMH (SEQ ID NO: 1), область HCDR2 NPYNDG (SEQ ID NO: 2) и область HCDR3 GTYYYGTRVFDY (SEQ ID NO: 3).

20. Способ по п. 18,

отличающийся тем, что антитело содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую область LCDR1 RSSKSLQNVNGNTYLY (SEQ ID NO: 4), область LCDR2 RMSNLNS (SEQ ID NO: 5) и область LCDR3 MQHLEYPIT (SEQ ID NO: 6).

21. Способ по любому из пп. 18-20,

отличающийся тем, что NK-клетки получают с помощью следующих стадий (i) - (iii):

стадию (i) выполнения стационарного культивирования выделенных NK-клеток в культуральной среде, содержащей антитела к CD3, цитокины и питающие клетки, чтобы стимулировать межклеточные контакты;

стадию (ii) добавления цитокинов, антител к CD3 и питающих клеток в среду для повторной стимуляции и повторного проведения стационарного культивирования для индукции межклеточных контактов; и

стадию (iii) добавления среды, содержащей цитокины, к клеткам и проведения стационарного или суспензионного культивирования при постоянном поддержании концентрации клеток и концентрации цитокинов.

22. Способ по любому из пп. 18-20,

отличающийся тем, что NK-клетки получают с помощью способа, включающего стадию совместного культивирования выделенных CD4(+) Т-клеток ex vivo или экспансионно-культивированных CD4 (+) Т-клеток ex vivo, в качестве питающих клеток, и клеток для посева.

23. Способ по п. 22,

отличающийся тем, что CD4(+) Т-клетки представляют собой линии CD4(+)/CD1(-) Т-клеток.

24. Способ по п. 23,

отличающийся тем, что линии CD4(+)/CD1(-) Т-клеток представляют собой линии клеток H9 или HuT78.

25. Способ по п. 22,

отличающийся тем, что клетки для посева представляют собой одну или более клеток, выбранных из группы, состоящей из клеток, полученных из периферической крови, лейкоцитов периферической крови, мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК), лейкоцитов пуповинной крови, мононуклеарных клеток пуповинной крови, естественных клеток-киллеров, полученных из стволовых клеток, обогащенных естественных клеток-киллеров и выделенных естественных клеток-киллеров.

26. Способ по любому из пп. 18-25,

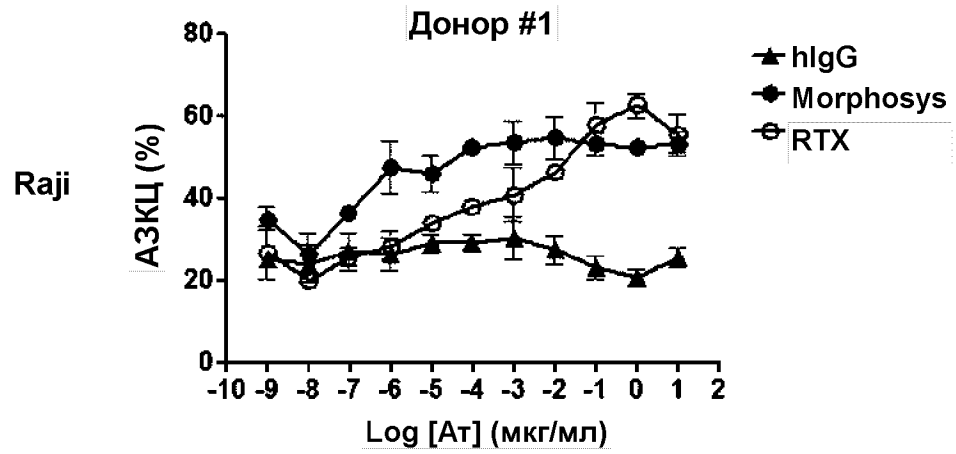
отличающийся тем, что злокачественное новообразование представляет собой по меньшей мере одно злокачественное новообразование, выбранное из группы, состоящей из злокачественного новообразования желудка, злокачественного новообразования печени, злокачественного новообразования легкого, колоректального злокачественного новообразования, злокачественного новообразования молочной железы, злокачественного новообразования простаты, злокачественного новообразования яичников, злокачественного новообразования поджелудочной железы, злокачественного новообразования шейки матки, злокачественного новообразования щитовидной железы, злокачественного новообразования гортани, острого лимфоцитарного лейкоза, опухоли головного мозга, нейробластомы, ретинобластомы, злокачественного новообразования головы и шеи, злокачественного новообразования слюнных желез, лимфомы и злокачественной опухоли В-клеточного происхождения.

27. Способ по любому из пп. 18-26,

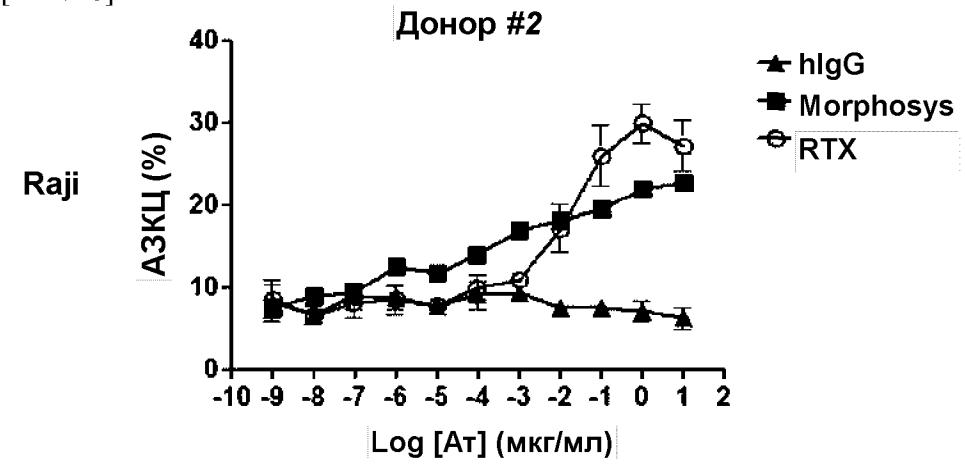
отличающийся тем, что стадия введения осуществляется путем введения антитела, специфичного к CD19, и NK-клеток в комбинации одновременно, последовательно или в обратном порядке.

По доверенности

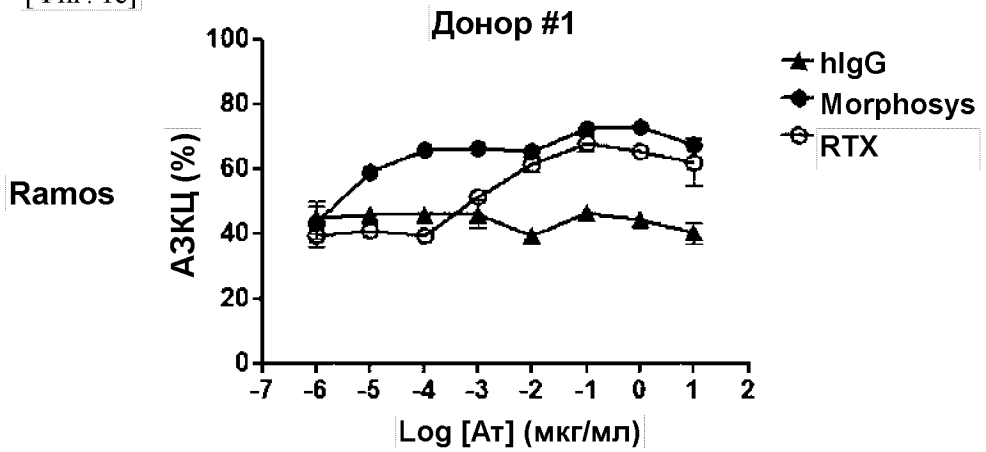
[Фиг. 1a]



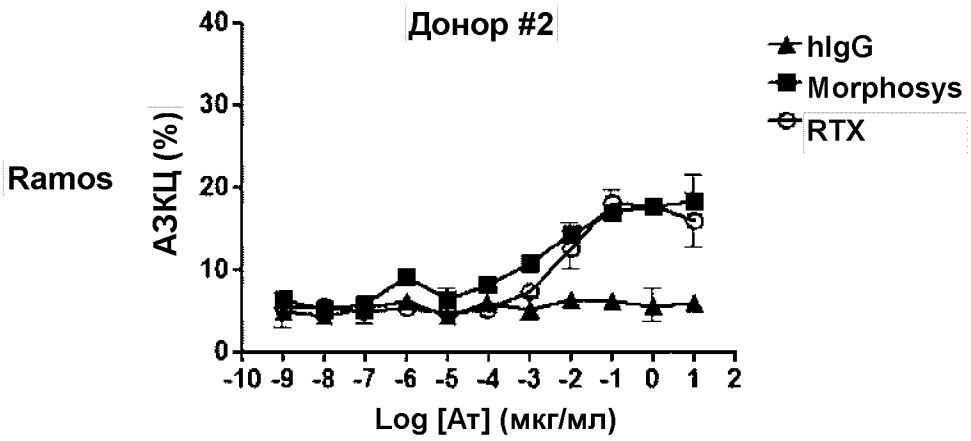
[Фиг. 1b]



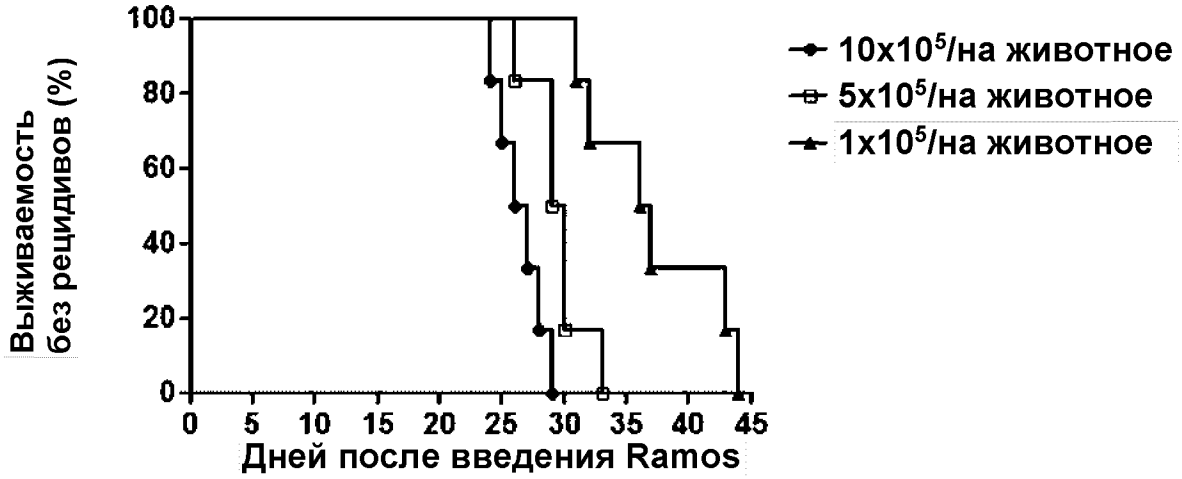
[Фиг. 1c]



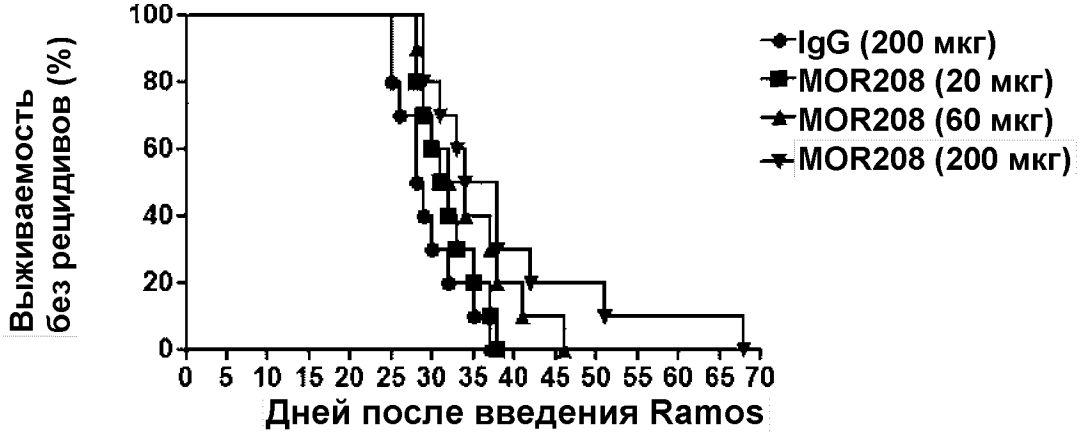
[Фиг. 1d]



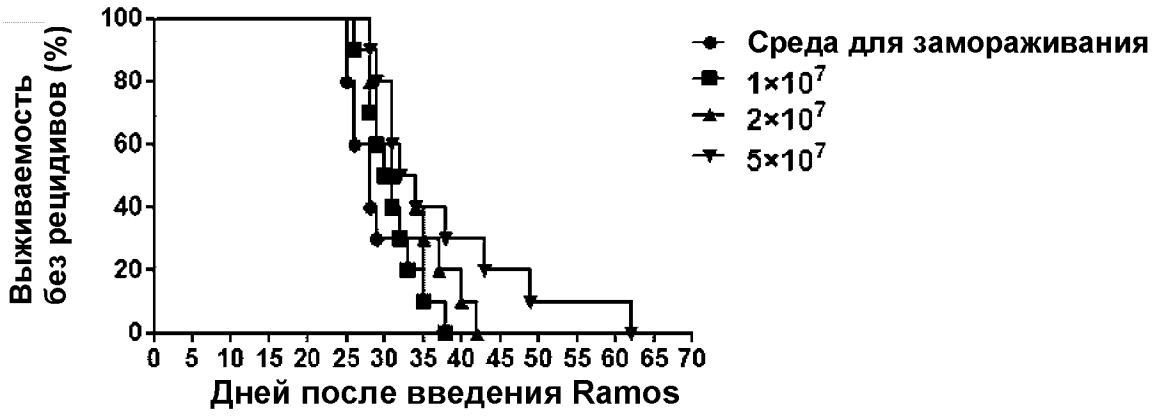
[Фиг. 2]



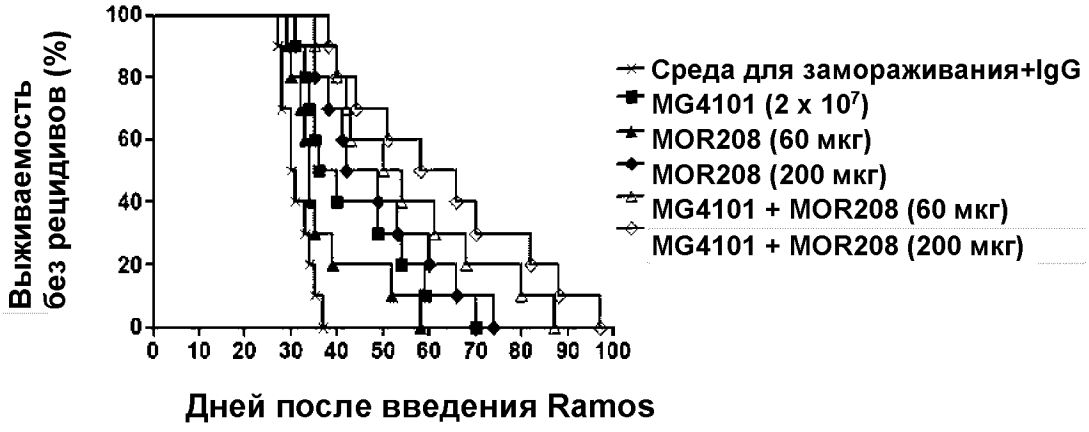
[Фиг. 3]



[Фиг. 4]


Выживаемость без рецидивов (%)
100
80
60
40
20
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
Дней после введения Ramos
Среда для замораживания
1×10^7
2×10^7
5×10^7

[Фиг. 5]


Выживаемость без рецидивов (%)
100
80
60
40
20
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
Дней после введения Ramos
Среда для замораживания+IgG
MG4101 (2 x 10^7)
MOR208 (60 мкг)
MOR208 (200 мкг)
MG4101 + MOR208 (60 мкг)
MG4101 + MOR208 (200 мкг)