



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 5/0639 (2021.02); C07K 14/525 (2021.02); C07K 14/5412 (2021.02); C07K 14/5421 (2021.02); C07K 14/5434 (2021.02); G01N 33/5023 (2021.02); G01N 33/5047 (2021.02); A61K 35/15 (2021.02); G01N 2333/525 (2021.02); G01N 2333/5412 (2021.02); G01N 2333/5421 (2021.02); G01N 2333/5434 (2021.02); G01N 2800/52 (2021.02)

(21)(22) Заявка: 2018113435, 14.09.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.09.2016

Дата регистрации:  
16.06.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
15.09.2015 US 62/219,058

(43) Дата публикации заявки: 16.10.2019 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 16.06.2021 Бюл. № 17

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 16.04.2018

(86) Заявка РСТ:  
US 2016/051781 (14.09.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2017/048875 (23.03.2017)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

БОШ Марникс Л. (US)

(73) Патентообладатель(и):

НОРТВЕСТ БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: DATTA J. et al., Optimizing  
Dendritic Cell-Based Approaches for Cancer  
Immunotherapy, YALE JOURNAL OF  
BIOLOGY AND MEDICINE, 2014, V. 87, N. 4,  
p.491-518. HAEGEL-KRONENBERGER H. et  
al., Adhesive and/or signaling functions of CD44  
isoforms in human dendritic cells, The Journal  
of Immunology, 1998, V. 161, N. 8, p.3902-3911.  
EP 2199793, 23.06.2010. (см. прод.)

(54) СПОСОБЫ, ОТНОСЯЩИЕСЯ К КОМПОЗИЦИЯМ АКТИВИРОВАННЫХ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК И К ИММУНОТЕРАПЕВТИЧЕСКОМУ ЛЕЧЕНИЮ ИНДИВИДУУМОВ С ПРОГРЕССИРУЮЩИМ РАКОМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способу определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток (DC), и может быть использовано в медицине. Предложенный способ, включающий определение относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и TNFα

и сравнение их с пороговыми значениями, может быть использован для повышения иммунотерапевтической активности популяции активированных дендритных клеток и определения эффективности иммунотерапии пациента. 5 н. и 16 з.п. ф-лы, 2 табл., 1 пр., 3 ил.

R U 2 7 4 9 6 1 0 C 2

R U 2 7 4 9 6 1 0 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/0784* (2010.01)  
*C07K 14/525* (2006.01)  
*C07K 14/54* (2006.01)  
*G01N 33/49* (2006.01)  
*A61K 35/15* (2015.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C12N 5/0639* (2021.02); *C07K 14/525* (2021.02); *C07K 14/5412* (2021.02); *C07K 14/5421* (2021.02); *C07K 14/5434* (2021.02); *G01N 33/5023* (2021.02); *G01N 33/5047* (2021.02); *A61K 35/15* (2021.02); *G01N 2333/525* (2021.02); *G01N 2333/5412* (2021.02); *G01N 2333/5421* (2021.02); *G01N 2333/5434* (2021.02); *G01N 2800/52* (2021.02)

(21)(22) Application: **2018113435, 14.09.2016**(24) Effective date for property rights:  
**14.09.2016**Registration date:  
**16.06.2021**

Priority:

(30) Convention priority:  
**15.09.2015 US 62/219,058**(43) Application published: **16.10.2019 Bull. № 29**(45) Date of publication: **16.06.2021 Bull. № 17**(85) Commencement of national phase: **16.04.2018**(86) PCT application:  
**US 2016/051781 (14.09.2016)**(87) PCT publication:  
**WO 2017/048875 (23.03.2017)**Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spaskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"**(72) Inventor(s):  
**BOSCH, Marnix, L. (US)**(73) Proprietor(s):  
**NORTHWEST BIOTHERAPEUTICS, INC.  
(US)**(54) **METHODS RELATED TO ACTIVATED DENDRITIC CELLS COMPOSITIONS AND TO IMMUNOTHERAPEUTIC TREATMENT OF INDIVIDUALS WITH ADVANCED CANCER**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the field of biotechnology, specifically to a method for determining the immunotherapeutic activity of a composition of activated dendritic cells (DC), and can be used in medicine.

EFFECT: proposed method, including determination

of relative amounts of IL-6, IL-8, IL-12 and TNF $\alpha$  and comparing them with threshold values, can be used to increase the immunotherapeutic activity of the population of activated dendritic cells and determine the effectiveness of immunotherapy of the patient.

21 cl, 2 tbl, 1 ex, 3 dwg

## ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ(ЫЕ) ЗАЯВКУ(И)

В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США с регистрационным номером 62/219058, поданной 15 сентября 2015, содержание которой во всей своей полноте и во всех целях вводится в настоящее описание посредством

5 ссылки.

### Предшествующий уровень техники

Пациенты с неоперабельными, локально прогрессирующими или метастазирующими солидными опухолями имеют плохой прогноз и ограниченный выбор методов терапии, особенно после безуспешно проведенной стандартной терапии. Amato, *Semin. Oncol.* 27:177-186, 2000; Bramwell *et al.*, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3:Cd003293, 2003; Kleiger *et al.*, *Ann. Oncol.* 25:1260-1270, 2014). В последнее время был достигнут некоторый прогресс в иммунотерапии рака (Ito *et al.*, *Biomed. Res. Int.* 2015:605478, 2015; West, *JAMA Oncol.* 1:115, 2015); однако, для достижения эффективного иммунного ответа против рака, иммунная система сначала должна быть стимулирована для атаки на раковые клетки. 15 (Melero *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 15:457-472, 2015). В частности, опухолеспецифические антигены должны быть представлены «необученным» Т-клеткам посредством антигенпрезентирующих клеток, что, в свою очередь, будет приводить к индуцированию дифференцировки Т-клеток в активированные цитотоксические Т-клетки (CTL). (Ito *et al.*, *Biomed. Res. Int.* 2015:605478, 2015; MacKeon *et al.*, *Front. Immunol.* 6:243, 2015).

Дендритные клетки (ДК) участвуют в инициации адаптивных иммунных ответов посредством поглощения антигенных соединений и последующей их презентации иммунной системе. ДК стимулируют В-клетки и Т-клетки и генерируют костимулирующие молекулы, такие как цитокины, для запуска экспансии CTL. (Banchereau *et al.*, *Nature* 392:245-252, 1998). В последние годы было проведено множество 25 исследований по иммунотерапии на основе ДК, поскольку известно, что ДК обладают способностью индуцировать широкий иммунный ответ. Клинические испытания с использованием противораковой вакцины на основе ДК давали различные обнадеживающие результаты, и некоторые из этих результатов были получены в последних клинических испытаниях на поздней стадии. (Anguille *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 30 67:731-753, 2015). Известно, что различные ДК, присутствующие в крови, участвуют в эффективной перекрестной презентации антигена и обладают способностью эффективно мигрировать в дренирующие лимфоузлы. Однако ДК содержат менее чем 1% мононуклеарных клеток периферической крови, а это означает, что такого клеточного материала недостаточно для получения композиции, иницирующей и поддерживающей 35 опухолеспецифический иммунный ответ. (MacKeon, *Front. Immunol.* 6:243, 2015; Anguille *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 67:731-753, 2015). В результате, *ex vivo* были генерированы ДК, происходящие от моноцитов, взятых у индивидуума, подвергаемого лечению, например, посредством лейкофереза, однако, в настоящее время исследуются стратегии, проводимые с использованием ДК других типов. После продуцирования ДК, эти клетки 40 обычно подвергают импульсной обработке антигеном и снова вводят пациенту в инфицированном виде. Выбор и источник антигена (например, очищенного опухолеспецифического или опухолеассоциированного антигена).

Преклинические исследования показали, что активированные ДК (аДК; DCVax®-Direct) являются более эффективными, чем незрелые ДК при клиренсе опухолей у мышей 45 после инъекции вовнутрь опухоли.

Дендритные клетки (ДК) представляют собой профессиональные антигенпрезентирующие клетки иммунной системы, которые, вероятно, обладают способностью активировать «необученные» Т-клетки и Т-клетки памяти. Дендритные

клетки, полученные *ex vivo*, все чаще применяются в иммунотерапии, а в частности, в иммунотерапии рака. Для получения дендритных клеток, обладающих оптимальными иммуностимулирующими свойствами, необходимо понимание биологии этих клеток и их применения для культивирования *ex vivo*. Были описаны различные протоколы культивирования этих клеток, и для каждого протокола были указаны различные преимущества.

Активация дендритных клеток инициирует процесс превращения незрелых ДК, которые, по своему фенотипу, сходны с кожными клетками Лангерганса, в зрелые антигенпрезентирующие клетки, которые могут мигрировать в лимфоузлы. Такой процесс приводит к постепенной и прогрессирующей потере эффективной способности поглощать антигены, присущей незрелым дендритным клеткам, и к активации экспрессии костимулирующих молекул клеточной поверхности и различных цитокинов. Созревание ДК может инициироваться различными раздражителями. Этот процесс является сложным, и полное созревание дендритных клеток, а в частности, моноцитарных дендритных клеток, по меньшей мере *in vitro*, зависит от используемого агента для созревания дендритных клеток и может проходить за 48 часов. Одним из последствий созревания является изменение мигрирующих свойств клеток *in vivo*. Так, например, индуцирование созревания незрелых дендритных клеток приводит к стимуляции нескольких хемокиновых рецепторов, включая CCR7, который направляет клетки на Т-клеточные области дренирующих лимфоузлов, где зрелые ДК активируют Т-клетки, направленные против антигенов, презентированных на поверхности ДК в окружении молекул МНС класса I и класса II. Термины «активация» и «созревание» и «активированный» и «зрелый» описывают процесс индуцирования и завершения превращения незрелых ДК (частично характеризующихся способностью поглощать антиген) в зрелые ДК (частично характеризующиеся способностью эффективно стимулировать Т-клеточные ответы *de novo*). В литературе, эти термины обычно употребляются как синонимы.

Известные протоколы созревания проводят в условиях *in vivo*, при которых ДК, вероятно, взаимодействуют с антигенами в процессе их обработки антигенами или после такой обработки. Одним из примеров такого подхода является использование кондиционированной моноцитами среды (МСМ) в качестве культуральной клеточной среды. МСМ получают путем культивирования моноцитов *in vitro* и их использования в качестве источника факторов созревания (см., например, заявку на патент США 2002/0160430, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки). Сообщалось, что основными компонентами в МСМ, ответственными за созревание, являются (про) воспалительные цитокины, интерлейкин 1 бета (IL-1 $\beta$ ), интерлейкин 6 (IL-6) и фактор некроза опухоли альфа (TNF $\alpha$ ). Другими агентами для созревания дендритных клеток являются, например, агонисты ловушко-подобных рецепторов в смесях цитокинов, таких как фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), интерлейкин (IL)-1 $\beta$ , IL-6 и простагландин E2 (PGE<sub>2</sub>).

Следовательно, созревание ДК может стимулироваться или инициироваться многими различными факторами, которые действуют посредством передачи сигнала хозяину. Следовательно, какого-либо одного пути созревания или результата такого созревания не существует, а фактически существует совокупность стадий созревания ДК, каждая из которых имеет свои собственные функциональные свойства. Концептуально, это имеет определенный смысл, поскольку для подавления различных факторов, представляющих угрозу для организма, на которую должна реагировать иммунная система, необходимо множество различных стратегий атаки. Так, например,

бактериальная инфекция лучше всего уничтожается посредством активированных макрофагов в совокупности со специфическими антителами, а вирусная инфекция лучше всего атакуется цитотоксическими Т-клетками, которые эффективно уничтожают инфицированные вирусом клетки. Уничтожение раковых клеток обычно происходит под действием комбинации цитотоксических Т-клеток, природных клеток-киллеров и антител.

Поэтому, для индуцирования иммунной системы, стимулирующей иммунный ответ только одного, а не другого типа, то есть, для поляризации иммунного ответа, может быть разработан способ созревания ДК *in vitro*. Направленное созревание ДК означает, что результат процесса созревания зависит от типа достигаемого иммунного ответа, наблюдаемого после лечения с использованием зрелых ДК. Проще говоря, направленное созревание стимулирует продуцирование популяции ДК, которая вырабатывает цитокины, разделяющие Т-клеточный ответ на иммунный ответ Th1-типа или Th2-типа. Интерферон  $\gamma$ , интерферон  $\alpha$  и полиизозиновая полицитидиловая кислота были использованы в целях получения агента для созревания дендритных клеток и для генерирования зрелых поляризованных ДК типа 1, которые секретируют IL-12. Зрелые ДК создают профиль Т-хелперных клеток 1 (Th1)-типа, которые участвуют в активации природных клеток-киллеров и CTL. (Maillard *et al.*, *Cancer Res.* 64:5934-5937, 2004; Trinchieri, *Blood* 84:4008-4027, 1994). Активация CTL запускает провоспалительный ответ и тем самым стимулирует эти клетки на направленное уничтожение опухолевых клеток. (Coulie *et al.*, *Nat. Rev. Cancer* 14:135-146, 2014).

ДК экспрессируют до девяти различных ловушко-подобных рецепторов (TLR1-TLR9), каждый из которых может быть использован для стимуляции созревания. Не является неожиданностью тот факт, что взаимодействие бактериальных продуктов с TLR2 и TLR4 приводит к направленному созреванию ДК и к поляризации ответа, направленного, главным образом, на уничтожение бактериальных инфекций. И наоборот, созревание, запускаемое TLR7 или TLR9, очевидно, инициирует ответ, направленный, главным образом, на уничтожение вирусов. В качестве дополнительного примера можно сказать, что в большинстве протоколов созревания был включен интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ), который стимулировал продуцирование интерлейкина 12 зрелыми ДК, обеспечивающими иммунный ответ Th1-типа. И наоборот, включение простагландина E<sub>2</sub> дает противоположный эффект.

Полностью зрелые дендритные клетки качественно и количественно отличаются от незрелых ДК. После полного созревания, ДК экспрессируют более высокие уровни антигенов МНС класса I и класса II, и более высокие уровни Т-клеточных костимулирующих молекул, таких как CD80 и CD86. Эти изменения повышают способность дендритных клеток активировать Т-клетки, поскольку они увеличивают плотность антигенов на клеточной поверхности, а также величину сигнала Т-клеточной активации посредством аналогов костимулирующих молекул на Т-клетках, например, CD28 и т.п. Кроме того, зрелые ДК продуцируют большое количество цитокинов, которые стимулируют и поляризуют Т-клеточный ответ. Такими цитокинами являются интерлейкин 12, который ассоциирован с иммунным ответом Th1-типа, и интерлейкин-10 и интерлейкин-4, которые ассоциированы с иммунным ответом Th2-типа.

Вообще говоря, методы получения ДК *ex vivo* включают генерирование клеточной популяции, обогащенной клетками-предшественниками ДК, взятыми у индивидуума, а затем дифференцировку клеток-предшественников ДК *in vitro* в полностью зрелые ДК до их введения индивидууму снова. Обычно, во время такого процесса созревания, ДК подвергаются контактированию с антигеном с последующим поглощением и

процессингом по мере созревания ДК. Существует мнение, что ДК должны подвергаться терминальной дифференцировке, либо они могут подвергаться обратной дифференцировке в моноциты/макрофаги, и существенно терять свою иммунопотенцирующую способность. *Ex vivo* созревание ДК, полученных из моноцитов, было успешно осуществлено с применением методов и агентов, хорошо известных специалистам.

Дендритные клетки (ДК) распознаются как носитель, подходящий для активной иммунотерапии рака. Эксперименты, проводимые на животных, продемонстрировали возможность применения иммунотерапии на основе ДК для защиты мышей от образования опухолей и для удаления уже укоренившихся опухолей. Результат этих успешных экспериментов был по меньшей мере частично подтвержден при проведении лабораторных клинических испытаний с участием человека. С точки зрения концепции безопасности или защиты, переход от лабораторных испытаний к более крупномасштабным испытаниям, в которых может быть продемонстрирована активность или эффективность препарата ДК, был затруднен из-за трудоемкого и громоздкого процесса получения описанного выше препарата. Тем не менее, несколько компаний проявили интерес к разработке противораковых вакцин на основе ДК, как продуктов, имеющих потенциально высокую терапевтическую ценность.

Помимо созревания, на результат лечения значительное влияние оказывает способ введения. Способ введения должен стимулировать доставку ДК в лимфоузлы, в которых они могут индуцировать дифференцировку Т-клеток. Ранее было исследовано несколько методов, включая внутривенную, интрадермальную и интранодальную инъекцию. (Anguille *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 67:731-753, 2015). Конкретной формой иммунотерапии на основе ДК является инъекция ДК вовнутрь опухоли (ИТ). После инъекции, «необученные» ДК поглощают и процессируют антиген(ы) *in vivo*, например, после апоптоза или гибели (некроза) опухолевых клеток и опухолевого окружения, и презентуют антиген(ы) Т-клеткам после их миграции в лимфоузлы. Действительно, было обнаружено, что эффективность такого лечения у животных-моделей коррелирует со степенью апоптоза опухоли (Candido *et al.*, *Cancer Res.* 61:228-236, 2001), что позволяет предположить, что этот подход является полностью совместимым с лечением опухолей химиотерапевтическими средствами или облучением перед инъекцией ДК. Кроме того, несколькими группами специалистов было продемонстрировано, что такая комбинированная терапия является особенно эффективной против укоренившихся опухолей (Nikitina *et al.*, *Int. J. Cancer* 94:825-833, 2001; Tanaka *et al.*, *Int. J. Cancer* 101:265-269, 2002; Tong *et al.*, *Cancer Res.* 61:7530-7535, 2001).

Поскольку опухолевые клетки *in vivo* являются источником антигена, внутриопухолевая инъекция необходима как для отбора, так и для продуцирования опухолевых антигенов, поскольку они используются в настоящее время в большинстве методов терапии на основе ДК *in vitro*. Отбор опухолевого антигена часто вызван необходимостью для компаний иметь такой антиген в собственном распоряжении, при этом, несколько опухолевых антигенов, идентифицированных до настоящего времени, еще не были проверены на значимый клинический эффект. Кроме того, использование таких опухолевых антигенов часто приводит к получению моновалентной иммуногенной композиции или вакцины, которая может потерять свою эффективность в случае ингибирования опухолевыми клетками экспрессии антигена, используемого при иммунизации. Кроме того, для получения опухолевого антигена в условиях, требуемых специалистами в соответствии со стандартной фармацевтической практикой (GMP), необходимы дополнительные расходы при проведении классических методов

иммунизации на основе ДК.

ИТ-инъекция ДК может подвергать дендритные клетки влиянию иммуносупрессорного опухолевого окружения. Известно, что опухоли продуцируют цитокины, которые инактивируют ДК или обладают способностью переключать Т-клеточный ответ на менее эффективный иммунный ответ Th2-типа. Некоторые группы ученых использовали генетическую модификацию ДК в попытке предотвратить такие супрессорные эффекты, в частности, посредством продуцирования цитокина интерлейкина-12 (IL-12; Nishioka *et al.*, *Cancer Res.* 59:4035-4041, 1999; Melero *et al.*, *Gene Therapy* 6:1779-1784, 1999) или экспрессии лиганда CD40 (Kikuchi *et al.*, *Blood* 96:91-99, 2000). Обнадеживающие результаты, полученные этими группами ученых, дополнительно продемонстрировали возможность введения ИТ-инъекции ДК как терапевтического подхода.

Trionzi *et al.* (*Cancer* 89:2647-2654, 2000) была описана ИТ-инъекция ДК пациентам с метастазирующей меланомой или раком молочной железы. Ими была достигнута регрессия опухоли у 4 пациентов с меланомой и у двух пациентов с карциномой молочной железы. Биопсия регрессирующих поражений показала инфильтрацию Т-клеток, что позволяет предположить, что ДК действительно активируют иммунный ответ против опухолевых клеток. В целом, эти данные продемонстрировали, что ИТ-инъекция ДК может быть введена человеку и может давать значимый клинический эффект. Однако, наблюдалось значительное ингибирование антигенов МНС класса II и костимулирующей молекулы B7-2 (CD86) на инъецированных ДК. Предполагается, что ингибирование этих играющих важную роль молекул будет снижать иммуностимулирующий потенциал ДК.

Один метод предотвращения такого ингибирования описан в заявке WO 2004/053072 (которая вводится в настоящее описание посредством ссылки), где указывается, что ингибирование может быть предотвращено посредством частичного созревания ДК перед введением. В этом методе, дендритные клетки-предшественники (клетки костного мозга после лизиса эритроцитов или моноцитарные предшественники дендритных клеток) сначала индуцируют *in vitro* для дифференцировки в незрелые дендритные клетки, а затем незрелые дендритные клетки индуцируют для инициации созревания путем их культивирования с агентом для созревания дендритных клеток, таким как БКГ и IFN $\gamma$ , липополисахарид (ЛПС), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), соединение имидазохинолина, синтетический двухцепочечный полирибонуклеотид, агонист ловушко-подобного рецептора (TLR), последовательность нуклеиновых кислот, содержащих неметилованные мотивы CpG, которые, как известно, индуцируют созревание ДК, комбинации цитокинов, таких как, например, фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) в комбинации с интерлейкином 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), интерлейкином 6 (IL-6) и простагландином E2 (PGE $_2$ ) или любые их комбинации. Незрелые дендритные клетки можно подвергать непрерывному созреванию в течение периода времени, который меньше, чем период времени, проходящий до полного созревания незрелых дендритных клеток. Если дендритные клетки подвергаются полному созреванию *in vitro*, то эти клетки будут терять свою способность поглощать и процессировать антиген после введения пациенту. В описанных здесь методах продемонстрировано, что дендритные клетки должны быть подвергнуты созреванию в течение периода времени, достаточного для активации, так, чтобы значительные уровни описанных здесь IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  продуцировались до выделения частично зрелых дендритных клеток, в целях получения препарата для введения пациенту или индивидууму, нуждающемуся в иммуностимуляции. Неожиданно было обнаружено, что активированные дендритные клетки, которые продуцируют некоторое количество или пороговое количество IL-6, IL-8, IL-12 и/или



TNF $\alpha$ , имеют уровень иммунотерапевтической активности, которая коррелирует с благоприятным исходом лечения, как было определено исходя из таких свойств, как увеличение продолжительности жизни и/или увеличение периода времени до рецидива рака. Таким образом, активированные дендритные клетки, которые продуцируют уровни, превышающие пороговые количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ , позволяют получить композиции с улучшенными свойствами, которые могут быть использованы для введения индивидууму, и эти композиции являются более эффективными для достижения благоприятного исхода лечения.

### **Сущность изобретения**

Этот раздел относится к выбору концепций в упрощенной форме, которая также изложена ниже в подробном описании изобретения. В этом разделе не рассматривается идентификация ключевых признаков заявленного предмета изобретения и не рассматривается их применение в целях определения объема заявленного предмета изобретения.

### **Описание чертежей**

Нижеследующие аспекты и многие имеющиеся преимущества настоящего изобретения будут более очевидными со ссылкой на подробное описание изобретения в комбинации с описанием чертежей, где:

На фигурах 1A-1C проиллюстрирована инфильтрация Т-клеток после обработки активированными ДК. Иммунохимическое окрашивание показало, что в опухоли инфильтрированы лимфоциты, включая активированные CD3<sup>+</sup>-Т-клетки.

Иммуногистохимическое окрашивание показало, что число инфильтрированных в опухоль лимфоцитов, включая активированные CD3<sup>+</sup>-Т-клетки, хелперные CD4<sup>+</sup>-клетки

и CD8<sup>+</sup>-клетки-киллеры, повышалось по сравнению с базовым уровнем у 15 из 27 пациентов, у которых была взята биопсия. Представлены репрезентативные изображения опухоли прозрачно-клеточной саркомы, обработанной 6 миллионами активированных ДК/инъекцию. Две инъекции были введены во время биопсии. Увеличение - 20 $\times$ , а масштаб - 200 мкм. На фиг. 1B и фиг. 1C проиллюстрировано продуцирование цитокинов активированными Т-клетками. Срезы тканей были зондированы на IFN $\gamma$  как показано на Fig. 1B, а на фиг. 1C показана экспрессия TNF $\alpha$ , оцененная с использованием RNAscope (темные точки), и проиллюстрировано совместное окрашивание на экспрессию CD3 (более светлые точки), проводимое с помощью иммуногистохимического анализа.

Черными стрелками показаны активированные CD3<sup>+</sup>-Т-клетки, экспрессирующие соответствующие цитокины. Белыми стрелками показаны цитокин-продуцирующие CD3<sup>-</sup>-клетки, вероятно, макрофаги. Представлены репрезентативные изображения опухоли прозрачно-клеточной саркомы, обработанной 6 миллионами активированных ДК/инъекцию. Две инъекции были введены во время биопсии. Увеличение - 20 $\times$ , а масштаб - 100 мкм.

На фигурах 2A-2F проиллюстрирована характеристика активированных ДК. На фигуре 2A проиллюстрирована корреляция между продуцированием IL-8 (нг/10<sup>6</sup> ДК/день) и общей продолжительностью жизни. Кривая Каплана-Мейера отображает зависимость продуцирования IL-8 от продолжительности жизни. Пунктирными линиями показана продолжительность жизни пациентов, которым была введена инъекция АДК, продуцирующих <985 нг/10<sup>6</sup> ДК/день (медианная концентрация IL-8); а сплошной линией показана продолжительность жизни пациентов, которым была введена инъекция клеток, продуцирующих  $\geq$  985 нг/10<sup>6</sup> ДК/день. На фигуре 2B проиллюстрирована корреляция

между продуцированием IL-12p40 (нг/10<sup>6</sup> ДК/день) и общей продолжительностью жизни. Кривая Каплана-Мейера отображает зависимость продуцирования IL-12p40 от продолжительности жизни. Пунктирными линиями показана продолжительность жизни пациентов, которым была введена инъекция активированных ДК, продуцирующих < 330 нг/10<sup>6</sup> ДК/день (медианная концентрация IL-12p40); а сплошной линией показана продолжительность жизни пациентов, которым была введена инъекция клеток, продуцирующих  $\geq 330$  нг/10<sup>6</sup> ДК/день. На фигуре 2С указано число пациентов со стабильным заболеванием (СЗ) на неделю 8 и их продолжительность жизни. На кривой Каплана-Мейера указано число пациентов с СЗ на неделю 8 по сравнению с числом пациентов с прогрессирующим заболеванием (ПЗ) на неделю 8. Пунктирной линией показана продолжительность жизни пациентов с ПЗ на неделю 8; а сплошной линией показана продолжительность жизни пациентов с СЗ на неделю 8. Общая продолжительность жизни значительно отличалась у пациентов двух групп ( $p=0,04$ ). На фигуре 2D проиллюстрировано продуцирование TNF $\alpha$  активированными ДК и статус заболевания на неделю 8. На черных гистограммах показано число пациентов с СЗ на неделю 8; а на белых гистограммах показано число пациентов с ПЗ. При этом отсутствовали пациенты с ПЗ, у которых на неделю 8 уровни TNF $\alpha$  составляли  $>130$  нг/10<sup>6</sup> ДК/день. В многомерном анализе, продуцирование TNF $\alpha$  коррелирует с выживаемостью ( $p=0,016$ ). На фиг. 2А-2D,  $n=39$ . На взаимосвязь между продолжительностью жизни пациента и уровнями экспрессии маркеров клеточной поверхности указывало окрашивание на МНС-II, как показано на фигуре 2Е, и окрашивание на CD86, как показано на фигуре 2F ( $n=25$  на обоих чертежах). На фигуре 2Е, сплошная линия соответствует пациентам с клетками, имеющими среднюю интенсивность флуоресценции  $> 12000$  (MFI), как показало окрашивание на МНС-II; пунктирная линия соответствует пациентам с клетками, имеющими среднюю интенсивность флуоресценции 6200-12000 MFI; а штриховая линия соответствует пациентам с клетками, имеющими  $< 6200$  MFI. На фигуре 2F, сплошная линия соответствует пациентам с клетками, имеющими среднюю интенсивность флуоресценции  $> 3400$  (MFI), как показало окрашивание на CD86; пунктирная линия соответствует пациентам с клетками, имеющими среднюю интенсивность флуоресценции 2000-3400 MFI; а штриховая линия соответствует пациентам с клетками, имеющими  $< 2000$  MFI. Логранговый критерий применяли в анализе, проиллюстрированном на фигурах 2А-2С и на фигурах 2Е-2F. Критерий хи-квадрат применяли в анализе, проиллюстрированном на фигуре 2D.

На фигуре 3 продемонстрирован фенотип активированных дендритных клеток. Представлены репрезентативные гистограммы проточной цитометрии для различных маркеров активации дендритных клеток. На темно-серых гистограммах проиллюстрирована моноцитарная популяция, собранная в процессе лейкофереза. На светло-серых гистограммах проиллюстрированы активированные ДК.

#### **Подробное описание изобретения**

Настоящее изобретение относится к способу определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток, где указанный способ включает стадии: (i) получения активированных дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ; (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6,

IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового.

5 Настоящее изобретение также относится к способу повышения иммунотерапевтической активности популяции активированных ДК, где указанный способ включает стадии: (i) получения популяции активированных дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ; (iii) сравнения  
10 определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; (iv) подтверждения того, что любой один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; и (v) добавления достаточного количества агента, который может индуцировать продуцирование одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  активированными ДК до тех пор, пока количество IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  не будет превышать пороговое количество, с получением  
15 популяции активированных ДК, обладающих повышенной иммунотерапевтической активностью.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу отбора пациента, отвечающего на введение активированных дендритных клеток, путем определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток,  
20 взятых у пациента, где указанный способ включает стадии: (i) получения активированных дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ; (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность,  
25 если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора пациентов, у которых наблюдаются уровни выше порогового, как восприимчивых  
30 пациентов.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу отбора пациента, не отвечающего на введение активированных дендритных клеток, путем определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток, взятых у пациента, где указанный способ включает стадии: (i) получения  
35 активированных дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ; (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень  
40 ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора пациентов, у которых наблюдаются уровни ниже порогового, как невосприимчивых пациентов.

45 Настоящее изобретение также относится к способу отбора агентов для созревания дендритных клеток в целях продуцирования активированных дендритных клеток с повышенной иммунотерапевтической активностью, где указанный способ включает стадии: (i) получения активированных дендритных клеток путем контактирования

незрелых дендритных клеток с тест-агентом для созревания дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ; (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора агента для созревания дендритных клеток, который индуцирует продуцирование активированных дендритных клеток на уровне выше порогового. После определения агента для созревания дендритных клеток, он может быть использован для индуцирования продуцирования частично зрелых и активированных дендритных клеток, описанных в настоящей заявке.

В типичном варианте любого из вышеуказанных способов, активированные дендритные клетки продуцируют пороговое количество, составляющее приблизительно от 50 до приблизительно 200 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 500 до приблизительно 2000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 30 до приблизительно 70 нг TNF $\alpha$ /1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 75 до приблизительно 100 нг субъединицы IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; и приблизительно от 1 до 3 нг биологически активного IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа. Активированные дендритные клетки могут также продуцировать приблизительно от 75 до приблизительно 150 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 750 до приблизительно 1500 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 1 до 3 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 30 до 70 нг TNF $\alpha$ /1 миллион клеток/24 часа или приблизительно 100 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа, и 1000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 2 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа; и по меньшей мере приблизительно 30 нг TNF $\alpha$ .

Активированные дендритные клетки, используемые в любом из вышеописанных вариантов осуществления изобретения, могут быть получены путем проведения следующих стадий: (i) выделения клеточной популяции, содержащей человеческие МКПК, из периферической крови; (ii) обогащения клеточной популяции, содержащей человеческие МКПК, человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток; (iii) культивирования клеточной популяции, обогащенной человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток, в среде для культивирования тканей, в которую было добавлено эффективное количество агента для дифференцировки дендритных клеток, в течение периода времени, достаточного для дифференцировки человеческих моноцитарных предшественников дендритных клеток в незрелые человеческие дендритные клетки; (iv) культивирования клеточной популяции, обогащенной незрелыми человеческими дендритными клетками, с эффективным количеством агента для созревания дендритных клеток, в целях активации незрелых человеческих дендритных клеток; и (v) выделения и промывки активированных человеческих дендритных клеток.

В другом варианте осуществления изобретения, активированные дендритные клетки получают путем проведения следующих стадий: (i) выделения клеточной популяции, содержащей человеческие моноцитарные предшественники дендритных клеток; (ii)

культивирования клеточной популяции, обогащенной человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток, в среде для культивирования тканей, в которую было добавлено эффективное количество агента для дифференцировки дендритных клеток, в течение периода времени, достаточного для дифференцировки человеческих моноцитарных предшественников дендритных клеток в незрелые человеческие дендритные клетки; (iii) культивирования клеточной популяции, обогащенной незрелыми человеческими дендритными клетками, с эффективным количеством агента для созревания дендритных клеток, в целях активации незрелых человеческих дендритных клеток; и (iv) выделения и промывки активированных человеческих дендритных клеток.

Агентом для дифференцировки дендритных клеток может быть GM-CSF без какого-либо другого цитокина или GM-CSF в комбинации с IL-4, IL-7, IL-13 или IL-15.

Моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть выделены из кожи, селезенки, костного мозга, тимуса, лимфоузлов, крови пупочного канатика или периферической крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения, моноцитарные клетки-предшественники дендритных клеток представляют собой неактивированные моноцитарные предшественники дендритных клеток. Кроме того, моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть взяты у отдельного индивидуума, подвергаемого лечению, или если у индивидуума отсутствует достаточное число восприимчивых моноцитарных предшественников дендритных клеток, то такие моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть взяты у здорового индивидуума, у которого имеется HLA-совместимость с отдельным индивидуумом, подвергаемым лечению.

Агентом для созревания дендритных клеток, используемым в способах продуцирования частично зрелых активированных дендритных клеток, могут быть инактивированная бацилла Кальметта-Герена (БКГ), БКГ в комбинации с интерфероном  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), липополисахаридом (ЛПС), фактором некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), соединением имидазохинолина, синтетическим двухцепочечным полирибонуклеотидом, агонистом ловушко-подобного рецептора (TLR), последовательностью нуклеиновых кислот, содержащих неметилованные мотивы CpG, которые, как известно, индуцируют созревание дендритных клеток, или любые их комбинации. Инактивированная БКГ может включать всю БКГ; БКГ, содержащую компоненты клеточных стенок; липоарабидоманнаны, происходящие от БКГ; или компоненты БКГ, и такая БКГ может представлять собой инактивированную БКГ, полученную путем термоинактивации, обработки формалином или их комбинациями. Обычно, эффективное количество БКГ составляет приблизительно от  $10^5$  до  $10^7$  к.о.е. на миллилитр среды для культивирования тканей, а эффективное количество IFN $\gamma$  составляет приблизительно от 100 до приблизительно 1000 единиц на миллилитр среды для культивирования тканей. Кроме того, соединением имидазохинолина может быть соединение имидазохинолин-4-амин, а обычно, 4-амино-2-этоксиметил- $\alpha,\alpha$ -диметил-1H-имидазол[4,5-с]хинолин-1,5-этанол или 1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин или их производное. Обычно, синтетический двухцепочечный полинуклеотид представляет собой поли[I]:поли[C(12)U].

#### **Описание вариантов осуществления изобретения**

Дендритные клетки представляют собой разнообразные популяции антигенпрезентирующих клеток, обнаруженных в ряде лимфоидных и нелимфоидных тканей. (см., Liu, *Cell* 106:259-262, 2001; Steinman, *Ann. Rev. Immunol.* 9:271-296, 1991). Дендритными клетками являются лимфоидные дендритные клетки селезенки, клетки Лангерганса в эпидермисе и клетки вуали в кровотоке. В целом, дендритные клетки

подразделяются на группы по их морфологии, высоким уровням экспрессии МНС класса II на поверхности, и по отсутствию некоторых других маркеров клеточной поверхности, экспрессирующихся на Т-клетках, В-клетках, моноцитах и природных клетках-киллерах. В частности, дендритные клетки, происходящие от моноцитов (также называемые моноцитарными дендритными клетками), обычно экспрессируют CD11c, CD80, CD86, и представляют собой HLA-DR<sup>+</sup> - и CD14<sup>+</sup>-клетки.

В противоположность этому, моноцитарные предшественники дендритных клеток (чаще всего моноциты) обычно представляют собой CD14<sup>+</sup>-клетки. Моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть получены из любой ткани, в которой они присутствуют, а в частности, из лимфоидных тканей, таких как селезенка, костный мозг, лимфоузлы и тимус. Моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть также выделены из системы кровообращения.

Периферическая кровь является легко доступным источником моноцитарных предшественников дендритных клеток. Другим источником моноцитарных предшественников дендритных клеток является кровь пупочного канатика. Моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть выделены из различных организмов, в которых может вырабатываться иммунный ответ. Такими организмами являются животные, включая, например, человека и животных, не являющихся человеком, таких как приматы, млекопитающие (включая собак, кошек, мышей и крыс), птицы (включая кур), а также их трансгенные виды.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, моноцитарные предшественники дендритных клеток и/или незрелые дендритные клетки могут быть выделены у здорового индивидуума или у индивидуума, нуждающегося в иммуностимуляции, например, у ракового пациента или у другого индивидуума, для которого может оказаться предпочтительной или желательной клеточная иммуностимуляция (то есть, у индивидуума с бактериальной или вирусной инфекцией или с гиперплазией и т.п.). Предшественники дендритных клеток и/или незрелые дендритные клетки могут быть также получены от HLA-совместимого здорового индивидуума для частичной активации и введены HLA-совместимому индивидууму, нуждающемуся в иммуностимуляции. В конкретном варианте осуществления изобретения, если предшественники дендритных клеток и/или незрелые дендритные клетки, выделенные у индивидуума, не образуют композиции активированных дендритных клеток, которые продуцируют факторы иммуностимулирующей активности на соответствующем уровне, то могут быть использованы предшественники дендритных клеток или незрелые дендритные клетки, происходящие от HLA-совместимого нормального донора.

#### **Предшественники дендритных клеток и незрелые дендритные клетки**

Методы выделения клеточных популяций, обогащенных предшественниками дендритных клеток, такими как неактивированные предшественники дендритных клеток и незрелые дендритные клетки, происходящие от различных источников, включая кровь и костный мозг, известны специалистам. Так, например, предшественники дендритных клеток и незрелые дендритные клетки могут быть выделены путем сбора гепаринизированной крови, путем афереза или лейкоафереза, путем приготовления лейкоцитарных пленок, розеткообразования, центрифугирования, центрифугирования в градиенте плотности (например, с использованием Фиколла® (такого как FICOLL-RAQUE®), PERCOLL® (частиц коллоидной двуокиси кремния (диаметром 15-30 нм), покрытых недиализуемым поливинилпирролидоном (ПВП)), сахарозой и т.п.), дифференциального лизиса клеток, фильтрации и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция лейкоцитов может быть получена, например,

путем забора крови у индивидуума, дефибринизации для удаления тромбоцитов и лизиса эритроцитов. Предшественники дендритных клеток и незрелые дендритные клетки могут быть, но необязательно, обогащены моноцитарными предшественниками дендритных клеток, например, путем центрифугирования в градиенте PERCOLL®, пэннинга антител и т.п.

Предшественники дендритных клеток и незрелые дендритные клетки могут быть, но необязательно, получены в закрытой асептической системе. Используемые здесь термины «закрытая асептическая система» или «закрытая система» означает систему, при которой минимизировано или устранено воздействие нестерильного воздуха, атмосферного воздуха или циркулирующего воздуха, или другого нестерильного окружения. При использовании закрытых систем для выделения предшественников дендритных клеток и незрелых дендритных клеток обычно не проводят центрифугирования в градиенте плотности в пробирках с открытым верхом, и не проводят перенос клеток на открытом воздухе, а также не осуществляют культивирования клеток в планшетах для культивирования тканей или в герметично не закрытых колбах и т.п. В типичном варианте осуществления изобретения, при использовании закрытой системы проводят асептический перенос предшественников дендритных клеток и незрелых дендритных клеток из сосуда для первого сбора в герметично закрытый сосуд для культивирования тканей без обработки нестерильным воздухом.

Другим описанным в литературе методом выделения предшественников дендритных клеток является использование коммерчески доступного пластикового субстрата (например, сфер или магнитных сфер), специально обработанного для селективного удаления прилипших моноцитов и других клеток, не являющихся «предшественниками дендритных клеток» (см., например, патенты США NN 5994126 и 5851756). Прилипшие моноциты и другие клетки, не являющиеся предшественниками дендритных клеток, отбрасывают, а неприлипшие клетки сохраняют для культивирования и созревания *ex vivo*. В другом методе, клетки, подвергнутые аферезу, культивируют в пластиковых пакетах для культивирования, в которые добавляют пластиковые сферы микроносителя, то есть, полистирола или стирола, для увеличения площади поверхности пакета.

Клетки культивируют в течение периода времени, достаточного для прилипания клеток к сферам и смыва неприлипших клеток из пакета. (Maffei, *et al.*, *Transfusion* 40: 1419-1420, 2000; заявка WO 02/44338, которая вводится в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых других вариантах осуществления изобретения, моноцитарные предшественники дендритных клеток выделяют путем адгезии на субстрате, связывающемся с моноцитами, как описано в заявке WO 03/010292, описание которой вводится в настоящее изобретение посредством ссылки. Так, например, популяция лейкоцитов (например, выделенная путем лейкоафереза) может быть подвергнута контактированию с субстратом, связывающимся с моноцитарными предшественниками дендритных клеток. При контактировании популяции лейкоцитов с субстратом, моноцитарные предшественники дендритных клеток, присутствующие в популяции лейкоцитов, преимущественно прилипают к субстрату. Другие лейкоциты (включая другие потенциальные предшественники дендритных клеток) обладают пониженной аффинностью связывания с субстратом, что позволяет моноцитарным предшественникам дендритных клеток преимущественно связываться с поверхностью субстрата.

Подходящими субстратами являются, например, субстраты, имеющие высокое отношение площади поверхности к объему. Таким субстратом может быть, например,

субстрат, состоящий из крупных частиц или волокна. Подходящими субстратами, состоящими из крупных частиц, являются, например, стеклянные частицы, пластиковые частицы, пластиковые частицы со стеклянной поверхностью, полистироловые частицы со стеклянной поверхностью, и другие сферы, подходящие для абсорбции белка.

5 Субстратами, состоящими из волокна, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются микрокапиллярные трубочки и микроворсинчатые мембраны и т.п. Субстрат, состоящий из крупных частиц или волокна, обычно позволяет прилипшим моноцитарным предшественникам дендритных клеток элюироваться без  
10 какого-либо значимого снижения жизнеспособности прилипших клеток. Субстрат, состоящий из крупных частиц или волокна, может быть, в основном, непористым, что облегчает элюирование моноцитарных предшественников дендритных клеток или дендритных клеток из субстрата. «По существу, непористым» субстратом является субстрат, в котором по меньшей мере большинство пор имеет размер меньше, чем клетки для минимизации захвата клеток в субстрате.

15 Адгезия моноцитарных предшественников дендритных клеток на субстрате может быть, но необязательно, повышена путем добавления связывающей среды. Подходящими связывающими средами являются, например, среда для культивирования моноцитарных предшественников дендритных клеток (например, AIM-V<sup>®</sup>, RPMI 1640, DMEM, XVIVO 15<sup>®</sup> и т.п.), в которую добавляют отдельно или в любой комбинации,  
20 например, цитокины (например, гранулоцитарный/макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), или GM-CSF в комбинации с интерлейкином 4 (IL-4), интерлейкином 15 (IL-15) или интерлейкином 13 (IL-13)), плазму крови, сыворотку (например, человеческую сыворотку, такую как аутологичная или аллогенная сыворотка), очищенные белки, такие как сывороточный альбумин, двухвалентные  
25 катионы (например, ионы кальция и/или магния) и другие молекулы, которые стимулируют специфическую адгезию моноцитарных предшественников дендритных клеток на субстрате, или предотвращают адгезию клеток, не являющихся моноцитарными предшественниками дендритных клеток, на субстрате. В некоторых вариантах осуществления изобретения, плазма или сыворотка крови может быть  
30 термоинактивированными. Термоинактивированная плазма может быть аутологичной или гетерологичной по отношению к лейкоцитам.

После адгезии моноцитарных предшественников дендритных клеток на субстрате, неприлипшие лейкоциты отделяют от комплексов моноцитарных предшественников  
35 дендритных клеток/субстрата. Для отделения неприлипших клеток от комплексов может быть применен любой подходящий метод. Так, например, смесь неприлипших лейкоцитов и комплексов может быть оставлена для осаждения с последующим декантированием или дренированием неприлипших лейкоцитов и среды. Альтернативно, смесь может быть центрифугирована, а супернатант, содержащий неприлипшие  
40 лейкоциты, может быть декантирован или дренирован из осажденных комплексов.

В другом методе, неактивированные моноцитарные предшественники дендритных клеток могут быть выделены из клеточной популяции, обогащенной лейкоцитами, полученными с использованием устройства для фильтрации в тангенциальном потоке, описанного в публикации Международной патентной заявки No. WO 2004/000444,  
45 поданной 19 июня 2003, а ныне в патенте США 7695627, который вводится в настоящее описание посредством ссылки. Устройство для фильтрации в тангенциальном потоке, подходящее для выделения клеточной популяции, обогащенной моноцитарными предшественниками дендритных клеток, может включать съемный блок, имеющий камеру для перекрестного потока, фильтрующую камеру и фильтр, расположенный



между ними. Этот фильтр имеет устройство для взаимодействия с жидкостью с одной стороны, и поверхность для ретентата и камеру для перекрестного потока, с другой стороны, а также фильтрующую поверхность в фильтрующей камере. Камера для перекрестного потока имеет впускное отверстие, адаптированное для введения образца компонентов крови, содержащего лейкоциты, в камеру для перекрестного потока, и камеру, расположенную параллельно поверхности для ретентата в фильтре. В камере для перекрестного потока также находится выпускное отверстие, расположенное в центральной части камеры напротив поверхности для ретентата в фильтре. Фильтр, подходящий для использования в устройстве для фильтрации в тангенциальном потоке, обычно имеет поры, средний размер которых составляет приблизительно от 1 до приблизительно 10 микрон. Фильтр может иметь средний размер пор приблизительно от 3 до приблизительно 7 микрон. Может быть также включено устройство для предварительной регуляции скорости подачи образца во впускное отверстие камеры для перекрестного потока и устройство для регуляции скорости прохождения фильтрата через фильтр и его подачи в фильтрующую камеру. Устройство для регуляции скорости фильтрации ограничивает скорость фильтрации до уровня, который меньше, чем скорость прохождения фильтрата через фильтр без сопротивления. Образец, содержащий компоненты крови, может находиться во входном устройстве, таком как устройство для лейкофереза, или в контейнере, содержащем образец, собранный из устройства для лейкофереза.

Моноцитарные предшественники дендритных клеток и клеточные популяции, обогащенные предшественниками, могут быть культивированы *ex vivo* или *in vitro* для дифференцировки и частичного созревания и/или размножения. Используемые здесь выделенные незрелые дендритные клетки, предшественники дендритных клеток и другие клетки представляют собой клетки, полученные искусственно, и существуют вне их природного окружения, а поэтому они не являются природным продуктом. Выделенные клетки могут существовать в очищенной форме, в получищенной форме или в неприродном окружении. Вкратце, дифференцировка дендритных клеток *in vitro* и/или *ex vivo* обычно включает культивирование моноцитарных предшественников дендритных клеток или популяций клеток, имеющих предшественников дендритных клеток в присутствии одного или более агентов для дифференцировки дендритных клеток. Подходящими агентами для дифференцировки могут быть, например, факторы роста клеток (например, цитокины, такие как GM-CSF, или комбинация GM-CSF и интерлейкина 4 (IL-4), интерлейкина 13 (IL-13), интерлейкина 15 (IL-15) или интерлейкина 7 (IL-7)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, моноцитарные предшественники дендритных клеток дифференцируются с образованием незрелых дендритных клеток, происходящих от моноцитов.

Предшественники дендритных клеток могут быть культивированы и дифференцированы в подходящих условиях культивирования *in vitro*. Подходящими средами для культивирования тканей, состоящих из дендритных клеток, являются, но не ограничиваются ими, AIM-V<sup>®</sup>, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15<sup>®</sup> и т.п. В среду для культивирования тканей могут быть добавлены сыворотка, плазма, аминокислоты, витамины, цитокины, такие как GM-CSF и/или IL-4, IL-7, IL-13, IL-15, двухвалентные катионы и т.п. для стимуляции дифференцировки клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, предшественники дендритных клеток могут быть культивированы в бессывороточной среде. Условия культивирования могут, но необязательно, исключать использование каких-либо продуктов животного происхождения. Типичная комбинация цитокинов, используемая в среде для

культивирования дендритных клеток, включает приблизительно 500 единиц/мл каждого из GM-CSF и IL-4, IL-7, IL-15 или IL-13. В типичном варианте осуществления изобретения, в котором используются неактивированные предшественники дендритных клеток, в стандартную среду для культивирования тканей, состоящих из дендритных клеток, может быть добавлен GM-CSF без любого другого цитокина. Если используется только GM-CSF, то в среду для культивирования тканей также обычно добавляют высокую концентрацию человеческого или животного белка для предотвращения адгезии неактивированных моноцитарных предшественников дендритных клеток на субстрате для культивирования тканей, и тем самым, для активации созревания предшественников дендритных клеток. Обычно, человеческий или животный белок добавляют в концентрации более, чем 1%, но чаще всего в концентрации 10% или менее. Человеческим или животным белком может быть альбумин, например, альбумин человеческой сыворотки, сыворотка, плазма, желатин, полиаминокислоты и т.п.

Предшественники дендритных клеток, после их дифференцировки в незрелые дендритные клетки, имеют фенотип, сходный с фенотипом кожных клеток Лангерганса.

Незрелые дендритные клетки обычно представляют собой CD14<sup>-</sup> и CD11c<sup>+</sup>-клетки, экспрессируют низкие уровни CD86 и CD83 и обладают способностью захватывать растворимые антигены посредством специализированного эндоцитоза.

Агентами для созревания дендритных клеток могут быть, например, но не ограничиваются ими, БКГ, ЛПС, TNF $\alpha$ , комбинация TNF $\alpha$ , интерлейкина (IL)-1 $\beta$ , IL-6 и простагландина E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), соединение имидазохинолина, например, соединение имидазохинолин-4-амин, такое как 4-амино-2-этоксиметил- $\alpha,\alpha$ -диметил-1H-имидазол [4,5-с]хинолин-1,5-этанол (обозначенный R848) или 1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин или их производные. (см., например, заявку WO2000/47719, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки), синтетический двухцепочечный полинуклеотид, например, поли[I]:поли[C(12)U] и т.п., агонисты ловушко-подобного рецептора (TLR), такого как TLR-3, TLR-4, TLR-7 и/или TLR-9, последовательность нуклеиновых кислот, содержащих неметилованные мотивы CpG, которые, как известно, индуцируют созревание ДК и т.п. или любые их комбинации. Кроме того, интерферон  $\gamma$  может быть объединен с одним или более из вышеуказанных агентов для созревания дендритных клеток в целях смещения созревания незрелых дендритных клеток в сторону фенотипа, который может индуцировать ответ Th1-типа. Перед дезактивацией, эффективное количество БКГ обычно составляет приблизительно от одного эквивалента до приблизительно 10<sup>5</sup>-10<sup>7</sup> к.о.е. на миллилитр среды для культивирования тканей. Эффективное количество IFN $\gamma$  обычно составляет приблизительно от 100 до приблизительно 1000 единиц на миллилитр среды для культивирования тканей.

Бацилла Кальметта-Герена (БКГ) представляет собой авирулентный штамм *Mycobacterium bovis*. Используемый здесь термин «БКГ» означает всю БКГ; БКГ, содержащую компоненты клеточных стенок; липоарабидоманнаны, происходящие от БКГ, и другие компоненты БКГ. БКГ является, но необязательно, инактивированной, такой как БКГ, полученная путем термоинактивации, обработки формалином или комбинацией методов термообработки и других методов инактивации и т.п. Эффективное количество соединения имидазохинолина, например, соединения имидазохинолин-4-амин, такого как 4-амино-2-этоксиметил- $\alpha,\alpha$ -диметил-1H-имидазол[4,5-с]хинолин-1,5-этанол (обозначенный R848), может составлять приблизительно от 1 до приблизительно 50 мкг/мл культуральной среды, но обычно используется от 5 до приблизительно 10

мкг/мл культуральной среды. Соединение имидазохинолина может быть использовано отдельно или в комбинации, например, с БКГ и/или IFN $\gamma$  или с дополнительным агонистом TLR.

Незрелые ДК обычно подвергают контактированию с эффективным количеством агента для созревания дендритных клеток, такого как БКГ и IFN $\gamma$ , в течение периода времени, достаточного для индуцирования созревания и для активации, но не полного созревания дендритных клеток. Обычно, если для созревания дендритных клеток используют БКГ и IFN $\gamma$ , то для полного созревания, время инкубирования обычно составляет по меньшей мере 24 часа и, в зависимости от используемого агента для созревания дендритных клеток, время инкубирования, необходимое для полного созревания, обычно составляет приблизительно от 48 до приблизительно 72 часов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в зависимости от используемого агента для созревания дендритных клеток, время инкубирования может составлять приблизительно от 5 часов до приблизительно 19 часов или более. В более типичном варианте осуществления изобретения, если используются БКГ и IFN $\gamma$ , то время, необходимое для неполного созревания и оптимальной активации дендритных клеток, может составлять приблизительно от 8 до приблизительно 19 часов или более. Незрелые дендритные клетки могут быть подвергнуты культивированию и частичному созреванию и активации в подходящих условиях культивирования для созревания клеток.

Подходящими средами для культивирования тканей, состоящих из дендритных клеток, являются, но не ограничиваются ими, AIM-V<sup>®</sup>, RPMI 1640, DMEM, X-VIVO 15<sup>®</sup> и т.п. В среду для культивирования тканей могут быть добавлены аминокислоты, витамины, цитокины, такие как GM-CSF, взятый отдельно (см., например, патент США No. 8389278, который во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки), или в комбинации с IL-4, IL-7, IL-13, IL-15, двухвалентными катионами и т.п. для стимуляции индуцирования созревания клеток. Типичным цитокином может быть белок GM-CSF человеческого или животного происхождения, взятый отдельно в высокой концентрации, либо GM-CSF, если он используется в комбинации, имеет концентрацию приблизительно от 500 единиц/мл до приблизительно 1000 единиц/мл GM-CSF, а концентрация IL-4, IL-13 или IL-15 составляет 100 нг/мл.

Мониторинг неполного созревания и активации незрелых дендритных клеток может быть осуществлен методами, известными специалистам по дендритным клеткам. Маркеры клеточной поверхности могут быть детектированы с помощью известных анализов, таких как проточная цитометрия, иммуногистохимический анализ и т.п.

Может быть также проведен мониторинг клеток на продуцирование цитокинов (например, с помощью ELISA, с помощью другого иммунного анализа или с использованием олигонуклеотидного массива). В ДК, которые были культивированы и подвергнуты неполному созреванию и оптимальной активации в соответствии с настоящим изобретением в присутствии агента для созревания дендритных клеток, такого как, например, но не ограничивающегося ими, БКГ и IFN $\gamma$ , повышенный уровень фосфорилированной JAK2 (активированной киназы Janus 2), по сравнению с уровнем в незрелых дендритных клетках, может быть детектирован для выявления инициации созревания методами, хорошо известными специалистам. Индуцирование экспрессии маркеров клеточной поверхности и цитокинов, а также фосфорилирование передающих сигнал молекул, например, jak2, также известны как индикатор поглощения антигена дендритными клетками после их кондиционирования *in vivo* и индуцирования иммунного ответа после введения этих дендритных клеток индивидууму.

Незрелые дендритные клетки были подвергнуты созреванию только в течение периода

времени, необходимого для инициации созревания незрелых дендритных клеток и для неполного созревания и активации дендритных клеток. Обычно, время инкубирования с эффективным количеством БКГ и эффективным количеством IFN $\gamma$ , составляющее приблизительно 5, или 8, или 10-19 часов, является подходящим для неполного созревания и активации дендритных клеток, используемых в виде композиции, если эти агенты были введены индивидууму в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем. Полностью зрелые ДК теряют свою способность поглощать антиген и обнаруживают повышенный уровень экспрессии костимулирующих молекул клеточной поверхности и различных цитокинов. В частности, зрелые ДК экспрессируют антигены МНС класса I и II на более высоких уровнях, чем незрелые дендритные клетки, и зрелые дендритные клетки были, по существу, идентифицированы как CD80<sup>+</sup>-, CD83<sup>+</sup>-, CD86<sup>+</sup>- и CD14<sup>-</sup>-клетки. Повышение уровня экспрессии МНС приводит к повышению плотности антигена на поверхности ДК, а активация костимулирующих молекул CD80 и CD86 приводит к усилению передачи сигнала активации Т-клеток посредством аналогов костимулирующих молекул, таких как CD28 на Т-клетках. Частично зрелые и активированные дендритные клетки, используемые в настоящем изобретении, обычно включают дендритные клетки, которые после их обработки агентом для созревания дендритных клеток, обнаруживают повышение уровня экспрессии костимулирующей молекулы на клеточной поверхности по сравнению с незрелыми дендритными клетками. Такими костимулирующими молекулами являются, но не ограничиваются ими, CD80, CD86 и/или CD54. Эти клетки могут экспрессировать, а могут и не экспрессировать, CD83, но они сохраняют свою способность эффективно поглощать и процессировать антиген. Кроме того, частично и оптимально зрелые дендритные клетки могут продуцировать один или любую комбинацию и/или все TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10 и/или IL-12, которые обычно не продуцируются незрелыми дендритными клетками в значительных количествах.

Активированные дендритные клетки, которые продуцируют определенное количество одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF- $\alpha$ , коррелируют с благоприятным исходом лечения. Благоприятный исход лечения может быть оценен, например, по увеличению продолжительности жизни и/или по увеличению периода времени до рецидива опухоли по сравнению с указанными факторами, наблюдаемыми у индивидуумов, которые не проходили лечение, либо проходили лечение по стандартной апробированной схеме лечения. Авторами настоящего изобретения было обнаружено, что активированные дендритные клетки, которые продуцируют приблизительно от 50 до приблизительно 200 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 500 до приблизительно 2000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 30 до приблизительно 70 нг TNF $\alpha$ /1 миллион клеток/24 часа; и/или по меньшей мере приблизительно от 75 до приблизительно 100 нг субъединицы IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; и приблизительно от 1 до 3 нг биологически активной субъединицы IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа, обладают иммунологической активностью, которая коррелирует с благоприятным исходом лечения. Эти цитокины/хемокины могут также продуцировать приблизительно от 75 до приблизительно 150 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, приблизительно 100 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 750 до приблизительно 1500 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, приблизительно 1000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа; и обладают иммунологической активностью, которая коррелирует с благоприятным исходом

лечения. Как описано ранее, благоприятный исход лечения характеризуется значительным увеличением продолжительности жизни или значительно более длительным периодом времени до рецидива опухоли или рака по сравнению с указанными факторами, наблюдаемыми у индивидуума с таким же опухолевым или раковым заболеванием, которые либо не проходили лечение, либо проходили лечение по стандартной апробированной схеме.

Полностью зрелые дендритные клетки не являются предпочтительными для осуществления настоящего изобретения, поскольку после полного созревания, они теряют свою способность эффективно поглощать и процессировать антиген. Кроме того, незрелые дендритные клетки, используемые в известных методах, являются нежелательными, поскольку в опухоли или в ткани, окружающей опухоль, обычно присутствует иммуносупрессорное окружение, включающее высокие концентрации цитокинов, которые, как известно, препятствуют процессингу антигена незрелыми дендритными клетками. В настоящем изобретении, неполное созревание и оптимальная активация незрелых дендритных клеток приводят к ингибированию рецепторов цитокинов на поверхности клеток, в результате чего эти клетки становятся менее чувствительными или менее восприимчивыми к любым иммуносупрессорным эффектам цитокинов во внутриопухолевом пространстве или в окружающей ткани, а поэтому, настоящее изобретение относится к клеткам, которые могут эффективно поглощать и процессировать антигены, присутствующие во внутриопухолевом пространстве или в окружающей ткани. Дендритные клетки поглощают и процессируют значительное количество опухолевого антигена из апоптотических и погибших опухолевых клеток, присутствующих во внутриопухолевом пространстве или в окружающей ткани. После введения, частично зрелые и оптимально активированные дендритные клетки созревают во внутриопухолевом пространстве, как было определено, например, по экспрессии хемокинового рецептора CCR7, и мигрируют в лимфоузлы, где эти клетки, презентирющие антиген, будут контактировать с Т-клетками и активировать иммунный ответ на любые опухолевые антигены, презентируемые дендритными клетками.

В соответствии с еще одним аспектом изобретения, различные ДК согласно изобретению могут быть сохранены, например, посредством криоконсервации как моноцитарные предшественники дендритных клеток, незрелые дендритные клетки до созревания или после неполного созревания, либо в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем, либо в отсутствии этого носителя. Агентами для криоконсервации, которые могут быть использованы, являются, но не ограничиваются ими, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, поливинилпирролидон, полиэтиленгликоль, альбумин, декстран, сахароза, этиленгликоль, изозэритрит, D-рибит, D-маннит, D-сорбит, инозит, D-лактоза, хлорид холина, аминокислоты, метанол, ацетамид, моноацетат глицерина и неорганические соли. При этом может иметь важное значение регулируемая скорость медленного охлаждения. Различные криопротективные агенты и клетки различных типов обычно имеют различные оптимальные скорости охлаждения.

Теплота фазы плавления, когда вода превращается в лед, должна быть минимальной. Процедура охлаждения может быть осуществлена с использованием, например, устройства для программируемого замораживания или охлаждающей бани с метанолом. Устройство для программируемого замораживания позволяет определять оптимальные скорости охлаждения и облегчать процедуру стандартного репродуцируемого охлаждения. Холодильники с программируемой и регулируемой скоростью охлаждения, такие как Cryomed<sup>®</sup> или Planar<sup>®</sup>, позволяют устанавливать режим охлаждения с нужной кривой скорости охлаждения.

После глубокой заморозки, моноцитарные клетки-предшественники, незрелые ДК и/или частично зрелые ДК, используемые в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или без этого носителя, могут быть быстро перенесены в криогенный сосуд для длительного хранения. В типичном варианте осуществления изобретения, образцы могут быть подвергнуты криогенному хранению в жидком азоте (-196°C) или на пару (-165°C). Условия и процедуры при манипуляциях, криоконсервации и длительном хранении гемопоэтических стволовых клеток, а в частности, клеток костного мозга или периферической крови, являются наиболее подходящими для клеток согласно изобретению. Такое обсуждение можно найти, например, в нижеследующих публикациях, которые вводятся в настоящее описание посредством ссылки: Taylor *et al.*, *Cryobiology* 27:269-78 (1990); Gorin, *Clinics in Haematology* 15:19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, Jul. 2226, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186.

Замороженные клетки, предпочтительно, быстро оттаивают (например, на водяной бане, поддерживаемой при 37°C - 41°C) и после оттаивания сразу охлаждают. При этом, может оказаться желательной обработка клеток для предотвращения слипания клеток после оттаивания. Для предотвращения слипания могут быть проведены различные процедуры, включая, но не ограничиваясь ими, добавление, до или после замораживания клеток, ДНКазы (Spitzer *et al.*, *Cancer* 45: 3075-85 (1980)), низкомолекулярного декстрана и цитрата, гидроксипропилированного крахмала (Stiff *et al.*, *Cryobiology* 20: 17-24 (1983)) и т.п. Криопротективный агент, если он оказывает токсическое действие на человека, должен быть удален до терапевтического применения оттаянных частично зрелых ДК. Одним из способов удаления криопротективного агента является разведение до незначительной концентрации. После замораживания, моноцитарные предшественники дендритных клеток, незрелые дендритные клетки и/или частично зрелые ДК оттаивают и выделяют, после чего эти клетки могут быть использованы в других методах получения частично зрелых активированных дендритных клеток или приготовления фармацевтического продукта. Приготовленные частично зрелые и оптимально активированные дендритные клетки могут быть введены как описано в настоящей заявке для незамороженных частично зрелых и оптимально активированных ДК.

#### Определение иммунотерапевтической активности частично зрелых и активированных дендритных клеток

Количество различных воспалительных цитокинов и хемокинов может быть определено методами, хорошо известными специалистам. В данном случае, количество одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ , продуцируемых активированными дендритными клетками, может быть ассоциировано с благоприятным исходом лечения. Благоприятный исход лечения может быть оценен, например, по значительному увеличению продолжительности жизни и/или по значительному увеличению периода времени до рецидива опухоли по сравнению с указанными факторами, наблюдаемыми у индивидуумов, которые не проходили лечение, либо проходили лечение по стандартной апробированной схеме лечения. Было неожиданно обнаружено, что активированные дендритные клетки, которые продуцируют приблизительно от 50 до приблизительно 200 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 500 до приблизительно 2000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 30 до приблизительно 70 нг TNF $\alpha$ /1 миллион клеток/24 часа; и/или по меньшей мере приблизительно от 75 до приблизительно 100 нг субъединицы IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; и приблизительно от 1 до 3 нг биологически активного IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа, обладают

иммунологической активностью, которая коррелирует с благоприятным исходом лечения. Эти цитокины/хемокины могут также продуцировать приблизительно от 75 до приблизительно 150 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, приблизительно 100 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 750 до 5 приблизительно 1500 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, приблизительно 1000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; а предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа.

Эти активированные дендритные клетки могут быть использованы для оценки 10 иммунотерапевтической активности для того, чтобы определить, может ли композиция активированных дендритных клеток давать благоприятный исход лечения при их введении индивидууму снова. Кроме того, анализ на иммунотерапевтическую активность может быть проведен для отбора пациентов, у которых, вероятно, будет вырабатываться значимый иммунный ответ против партий композиций дендритных клеток, которые, 15 как предполагается, не продуцируют значимого иммунного ответа при их введении индивидууму снова, или для скрининга агентов для активации дендритных клеток, которые могут продуцировать желаемые уровни одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα. Если периферическая кровь, взятая у индивидуума, не продуцирует активированные дендритные клетки, способные продуцировать 20 желаемые уровни одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα, то пациенту может потребоваться лечение путем введения активированных дендритных клеток, взятых у HLA-совместимого нормального донора.

Способы определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток могут включать стадии: (i) получения 25 активированных дендритных клеток любыми методами, описанными выше; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα любым методом, хорошо известным специалистам; (iii) сравнения определенного количества одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα с пороговым количеством; и (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет 30 низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα имеют уровень выше порогового. Пороговые количества IL-6, 35 IL-8, IL-12 и TNFα указаны выше. Если активированные дендритные клетки обладают повышенной иммунотерапевтической активностью, то активированные дендритные клетки могут быть приготовлены для их введения в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к способу повышения 40 иммунотерапевтической активности популяции активированных ДК. Указанный способ включает стадии: (i) получения популяции активированных дендритных клеток; (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα методом, хорошо известным специалистам; (iii) сравнения определенного количества одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα с пороговым количеством; (iv) 45 подтверждения того, что один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα имеют уровень ниже порогового; и (v) добавления достаточного количества агента, который может индуцировать продуцирование одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNFα активированными ДК до тех пор, пока количество

IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  не будет превышать пороговое количество, с получением популяции активированных ДК, обладающих повышенной иммунотерапевтической активностью.

In vivo введение частично зрелых дендритных клеток

5 Настоящее изобретение относится к способам и композициям для введения частично зрелых и активированных дендритных клеток или клеточной популяции, обогащенной этими клетками и содержащей такие клетки, индивидууму, например, с раком или опухолью. В некоторых вариантах осуществления изобретения, такие способы осуществляют путем получения предшественников дендритных клеток или незрелых  
10 дендритных клеток, дифференцировки и неполного созревания этих клеток в присутствии агента для созревания дендритных клеток, такого как БКГ и IFN $\gamma$ , или любого другого агента для созревания дендритных клеток, например, агентов, перечисленных выше. Частично зрелые и активированные дендритные клетки могут быть приготовлены практически врачом в криогенном состоянии. Перед введением, замороженные клетки  
15 быстро оттаивают, охлаждают и приготавливают вместе с физиологически приемлемым носителем, наполнителем, буфером и/или разбавителем с применением методов и композиций, хорошо известных специалистам. Частично зрелые и активированные дендритные клетки могут быть введены непосредственно индивидууму, нуждающемуся в иммуностимуляции. Обычно, приблизительно от  $10^2$  до приблизительно  $10^{10}$  клеток  
20 суспендируют в фармацевтически приемлемом носителе, например, в забуференном фосфатом физиологическом растворе. Эти клетки вводят либо непосредственно в опухоль, либо в область, находящуюся рядом с опухолью или поблизости от опухоли, либо в кровеносные сосуды или в лимфатические протоки, которые контактируют с опухолью или с ложем опухоли, для гарантии доступа клеток к раковому или  
25 опухолевому антигену.

Не ограничиваясь конкретными примерами, следует отметить, что клетки могут быть введены непосредственно в опухоль, в ложе опухоли после хирургического удаления или резекции опухоли, в околоопухолевое пространство, в дренирующие  
30 лимфоузлы, находящиеся в прямом контакте с опухолью, в кровеносные сосуды или в лимфатические протоки, проходящие в опухоль или питающие опухоль или орган, пораженный опухолью, например, в воротную вену или в легочную вену или артерию и т.п. Введение частично и оптимально зрелых дендритных клеток согласно изобретению может быть осуществлено одновременно с другим лечением или после другого лечения  
35 опухоли, такого как химиотерапия или лучевая терапия. Кроме того, частично зрелые дендритные клетки согласно изобретению могут быть введены вместе с другим агентом, который действует как адъювант для созревания дендритных клеток и/или процессинга антигена в опухоли или в области, расположенной рядом с опухолью или поблизости от опухоли. Кроме того, дендритные клетки могут быть также приготовлены или  
40 компаундированы в матрицу пролонгированного высвобождения для имплантации в область опухоли или ложа опухоли, или находящуюся рядом область так, чтобы клетки медленно высвобождались в опухоль или в ложе опухоли и контактировали с опухолевыми антигенами.

Термин «опухоль», используемый в настоящем изобретении, включает солидные опухоли, такие как, например, но не ограничивающиеся ими, саркома; опухоль  
45 поджелудочной железы; опухоль прямой и ободочной кишки; меланома; опухоль легких; опухоль молочной железы; опухоль яичника; опухоль головы и шеи; опухоль желудка; опухоль предстательной железы; опухоль пищевода; опухоль шейки матки или влагалища; опухоль головного мозга, такая как, например, глиобластома,



астроцитомы, менингиомы или медуллобластомы и т.п. Другие солидные опухоли также подвергают лечению с применением описанных здесь композиций или способов.

Частично зрелые и активированные дендритные клетки согласно изобретению могут быть введены любыми способами, подходящими для введения такого препарата. Так, например, клетки могут быть объединены с фармацевтически приемлемым носителем и введены с помощью шприца, катетера, канюли и т.п. Как указывалось выше, клетки могут быть приготовлены в матрице пролонгированного высвобождения. При введении таким способом, препарат может быть введен методом, подходящим для использования такой матрицы. Другие способы и методы введения, применимые для осуществления настоящего изобретения, хорошо известны специалистам.

Композиции согласно изобретению могут быть использованы как таковые для лечения индивидуума. Кроме того, эти композиции могут быть использованы в комбинации с любым другим методом лечения рака или опухоли. Так, например, способы согласно изобретению могут быть применены в комбинации с хирургическим удалением опухоли, с химиотерапией (с использованием цитотоксических лекарственных средств, апоптотических агентов, антител и т.п.), с лучевой терапией, криотерапией, брахитерапией, иммунотерапией (путем введения антигенспецифических зрелых активированных дендритных клеток, НК-клеток, антител, специфичных к раковым клеткам или к опухолевому антигену и т.п.) и т.п. Любой и все эти способы могут быть также применены в любой комбинации. Комбинированное лечение может быть проведено одновременно или последовательно, и может быть осуществлено в любом порядке, назначенном лечащим врачом.

В другом варианте осуществления изобретения, дендритные клетки и индивидуум-реципиент имеют МНС (HLA) одного и того же гаплотипа. Методы определения HLA-гаплотипа у индивидуума известны специалистам. В родственном варианте осуществления изобретения, частично зрелые дендритные клетки являются аллогенными для индивидуума-реципиента. Аллогенные клетки обычно соответствуют по меньшей мере одному аллелю МНС (например, имеют по меньшей мере один общий аллель МНС, но не все аллели МНС). В менее типичном варианте осуществления изобретения, дендритные клетки и индивидуум-реципиент являются аллогенными по отношению друг к другу, и все они имеют по меньшей мере один общий аллель МНС.

Противоопухолевый иммунный ответ может быть определен любым одним или более хорошо известными методами. Так, например, противоопухолевый ответ может быть определен по уменьшению размера опухоли, по индуцированию гибели опухолевых клеток или некроза опухолевых клеток, по снижению уровня пролиферации опухолевых клеток или по инфильтрации опухолевых антигенспецифических Т-клеток (TIL) и т.п.

### **Примеры**

Нижеследующие примеры представлены лишь для иллюстрации различных аспектов настоящего изобретения, и они не должны рассматриваться как ограничение описанных здесь способов и композиций. Хотя в настоящем изобретении проиллюстрированы и описаны предпочтительные варианты способа, однако, очевидно, что в них могут быть внесены различные модификации, не выходящие за рамки существа и объема настоящего изобретения.

В этом примере, активированные дендритные клетки тестировали в исследовании с увеличением доз для лечения различных солидных опухолей.

### **Методы**

Сорок индивидуумов были включены в это исследование с увеличением доз для оценки безопасности и целесообразности инъекции в солидные опухоли активированных

ДК (аДК), включая оптимально активированные дендритные клетки. В скрининг-исследование были включены индивидуумы в возрасте 18-75 лет с локально прогрессирующим или метастазирующим заболеванием, которое было подвергнуто по меньшей мере одной противоопухолевой терапии в течение 12 недель. Другим критерием включения в лечебную группу является статус по баллам 0 или 1, утвержденный группой специалистов-онкологов Восточного медицинского сообщества (ECOG), где указанными критериями являются: наличие по меньшей мере одной опухоли с массой более, чем 1 см в диаметре, подходящей для внутриопухолевой инъекции и расположенной на расстоянии от основных сосудистых структур или участков и затрудняющей глотание (например, опухоли верхних дыхательных путей); продуцирование числа моноцитов, достаточного для проведения курса лечения с полной дозой; предполагаемая продолжительность жизни более чем 6 месяцев и адекватные функции костного мозга и почек. Из исследования были исключены индивидуумы, у которых в анамнезе было аутоиммунное заболевание или которым была сделана трансплантация органов. Другими критериями исключения являются положительный анализ на ВИЧ-1, 2 или HTLV-I или II; проведение интенсивной миелосупрессорной или миелотоксической химиотерапии за 4 недели до первой инъекции; проведение противораковой иммунотерапии в течение 2 лет; наличие метастазов в головном мозге, которые не были подвергнуты лечению; проведение текущей терапии стероидами или антикоагулянтами; или наличие острой или неконтролируемой инфекции. Характеристики этих индивидуумов систематизированы в Таблице 1.

**Таблица 1. Базовые характеристики пациентов, подвергаемых лечению**

Характеристики, n=39		Всего
25	Возраст, годы, медиана (интервал)	53 (30-73)
	Пол, n (%)	
	Мужчина	18 (46,2)
	Женщина	21 (53,8)
	Тип заболевания, n (%)	
30	Аденокарцинома поджелудочной железы	5 (12,8)
	Саркома	9 (23,1)
	Рак прямой и ободочной кишки	7 (17,9)
	Нейроэндокринное заболевание	4 (10,3)
	Меланома	6 (15,4)
	Рак легких	3 (7,7)
	Рак молочной железы	2 (5,1)
	Рак яичника	1 (2,6)
	Рак мочевого пузыря	1 (2,6)
	Холангиокарцинома	1 (2,6)
35	Число проведенных ранее терапий, n (%)	
	≤ 2	20 (51,3)
	3-5	12 (30,8)
	≥ 6	7 (17,9)

#### Протокол исследования

В этом исследовании была проведена оценка безопасности и эффективности активированных ДК. Часть исследования с увеличением доз включала протокол «3+3». В это исследование были включены три дозы: 2 миллиона, 6 миллионов и 15 миллионов активированных ДК на инъекцию.

Каждый индивидуум подвергался лейкофезу для сбора моноцитов, клеток-предшественников ДК. Активированные ДК (аДК; торговый знак DCVax<sup>®</sup>-Direct) были получены как описано ниже. Первая инъекция аДК была введена приблизительно через

3 недели после лейкофереза, а последующие инъекции были введены через 1, 2, 8, 16 и 32 недели после первой инъекции. Все инъекции были введены в соответствии со схемой визуализации с помощью ультразвуковой или компьютерной томографии (КТ) путем введения направляющей иглы вовнутрь опухоли, а затем, с помощью более тонкой  
 5 иглы, продукт доставлялся непосредственно в опухолевую ткань. При каждой иммунизации, иглу вводили 3-4 раза для доставки клеток в маргинальную часть опухоли с последующим усилением контакта аДК с уже погибшими и погибающими опухолевыми клетками во избежание попадания одной дозы препарата в некротический центр опухолевой массы. После инъекции, индивидуумов обследовали в течение 2 часов, и  
 10 через каждые 30 минут анализировали жизненно важные функции (частоту сердечных сокращений, температуру и кровяное давление).

#### **Дозоограничивающая токсичность (DLT) и максимально допустимая доза (MTD)**

DLT определяют по любому из следующих критериев: оценка  $\geq 3$ , где после инъекции в определенный участок наблюдаются такие реакции, как появление клинических  
 15 симптомов и симптомов аутоиммунного заболевания; оценка  $\geq 2$ , аллергическая реакция; оценка  $\geq 2$ , иммунная реакция в течение 3 или более дней, или реакция, требующая введения лекарственного средства; оценка  $\geq 3$ , токсичность в соответствии с критериями общей токсичности, разработанными специалистами Национального Института рака v.4 (NCI CTC); или оценка 4 или опасные для жизни симптомы, которые не ассоциируются  
 20 с прогрессированием злокачественной опухоли. Максимально допустимую дозу (MTD) определяют как наивысшую дозу, при которой у более, чем одной трети индивидуумов наблюдается дозоограничивающая токсичность (DLT).

#### **Оценка эффективности**

Эффективность лечения оценивали путем проведения исследований с помощью  
 25 компьютерной томографии (КТ) или магнитно-резонансной томографии (МРТ) в соответствии с критериями оценки ответа для солидных опухолей v. 1.1 (Eisenhauer *et al.*, *Eur. J. Cancer* 4:228-247, 2009) или критериями, ассоциированными с иммунным ответом (Hoos *et al.*, *J. Nat'l. Cancer Inst.* 102:1388-1397, 2010). Вкратце, прогрессирующее заболевание (ПЗ) определяли как  $\geq 20\%$  увеличение суммы диаметров оцениваемого  
 30 поражения по сравнению с наименьшей суммой, наблюдаемой в процессе исследования, причем, абсолютная сумма должна превышать  $\geq 5$  мм. Стабильное заболевание (СЗ) определяли как состояние, при котором происходит недостаточное уменьшение опухоли и которое квалифицируется как частичный ответ ( $\geq 30\%$  снижение диаметра анализируемого поражения), а также как состояние, при котором происходит  
 35 недостаточный рост опухоли и которое квалифицируется как ПЗ.

#### **Получение активированных ДК**

Моноциты очищали от продукта, образующегося после лейкофереза, путем фильтрации в тангенциальном потоке. Клетки помещали в тефлоновые пакеты для культивирования тканей (Saint-Gobain, Malvern, PA) и подвергали дифференцировке в  
 40 незрелые ДК в течение 5 дней в присутствии гранулоцитарного/макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF плюс 2% альбумин человеческой сыворотки). Клетки культивировали в течение 5 дней, а затем добавляли погибшие микобактерии БКГ и IFN $\gamma$  для индуцирования активации ДК и оставляли приблизительно на 10-19 часов. После активации, активированные дендритные клетки ресуспендировали в  
 45 небольшом объеме RPMI-1640, 40% альбумина человеческой сыворотки и 10% ДМСО, и клетки подвергали криозащите в виде препарата для введения одной целой дозы. Проточную цитометрию осуществляли на клетках путем поиска маркеров активации дендритных клеток (фигура 3).

### Определение уровней цитокинов

Серию специально приготовленных мультиплексных магнитных сфер (Luminex Corp., Austin, TX) для TNF $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 и IL-12p40 и серию синглетных сфер для IL-12p70 (Invitrogen, Carlsbad, CA) использовали для определения концентраций цитокинов в освещенных супернатантах, выделенных из продукта культуры DCVax-Direct в соответствии с протоколом производителей. Данные представлены как средняя величина для двух определений, нормализованная на миллион живых ДК.

### Оценка биоптатов опухоли

Биоптаты опухоли фиксировали формалином и заливали в парафин (FFPE) стандартными методами. Все иммуногистохимические анализы проводили в лаборатории QualTek Molecular Laboratories (Santa Barbara, CA).

*In situ* детектирование транскриптов IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  в FFPE-образцах осуществляли с помощью анализа RNAscope с использованием зондов Hs-IFN $\gamma$  и Hs-TNF $\alpha$  (cat#310501 и 310421 соответственно, Advanced Cell Diagnostics (ACD), USA), а также зонда PPIB, служащего в качестве позитивного контроля (cat#313901), и набора реагентов RNAscope 2.0 HD (Brown) (cat#310035, ACD, USA) в соответствии с процедурами, рекомендованными производителями. Для подтверждения специфичности к IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  с помощью RNAscope, МКПК, взятые у трех здоровых доноров, тестировали до и после стимуляции Т-клеток. Для стимуляции Т-клеток, МКПК выделяли с использованием фиколла-пака (Sigma-Aldrich), ресуспендировали в среде RPMI-1640, в которую было добавлено 10% фетальной бычьей сыворотки, и обрабатывали 50 нг/мл миристата-ацетата форбола (PMA) и 1 мкг/мл иономицина (Sigma-Aldrich) в течение 5 часов при 37°C и 5% CO $_2$ .

Клетки фиксировали в 10% нейтрально забуференном формалине (NBF) в Histogel®, обрабатывали и заливали в FFPE-блоки. Затем, срезы (5 мкм) тестировали с использованием RNAscope как указано выше. Стимулированные Т-клетки давали значительное увеличение уровней IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  по сравнению с необработанными клетками. Цифровые изображения окрашенных предметных стекол получали с помощью цифрового сканера для предметных стекол Aperio ScanScope XT.

### Статистический анализ

Для того, чтобы определить, ассоциированы ли уровни цитокинов с исходом лечения, проводили статистические анализы. Кроме того, был проведен анализ для того, чтобы определить, могут ли базовые характеристики или лечебные факторы быть прогностическими показателями уровней цитокинов или исхода лечения. Ответ оценивали по двум переменным: СЗ на неделю 8 как бинарная переменная и продолжительность жизни. При анализе мультиплексности, коррекцию не проводили. Величина  $p=0,05$  рассматривалась как статистически значимая.

Сначала давали описательные оценки по уровням цитокинов, включая корреляции между параметрами активности. Затем оценивали ассоциацию между базовыми характеристиками или лечебными факторами и уровнями цитокинов с применением непараметрических методов ANOVA (Уилкоксона). Были построены графики параметрического рассеяния для всех пар уровней цитокинов. Для построения графиков зависимости продолжительности жизни от отдельных уровней цитокинов использовали модель пропорциональных рисков, а для того, чтобы определить, могут ли конкретные параметры служить более вероятными прогностическими факторами в объединенной модели, использовали возвратную регрессию. Для построения графиков зависимости СЗ на неделю 8 от отдельных уровней цитокинов использовали логистическую модель, а для того, чтобы определить, могут ли конкретные параметры служить более вероятными прогностическими факторами в объединенной модели, использовали

возвратную регрессию. Модели пропорциональных рисков, логистические модели, критерии трендов или критерии отношения вероятностей  $\chi^2$  были использованы для оценки связи между базовыми характеристиками или лечебными факторами и продолжительностью жизни, а СЗ на неделю 8 рассматривалось как показатель такой связи и конечная точка. Кривые Каплана-Мейера были построены по данным продолжительности жизни в зависимости от уровней цитокинов, а медианную величину использовали для каждого цитокина как пороговую величину для двух групп.

Исходя из результатов анализов и исследования кривых рассеяния, была создана группа обследуемых пациентов, в которую могли входить возможные «аутсайдеры» или, возможно, особая группа индивидуумов (как описано в разделе «Результаты»). Эти анализы повторяли с использованием уже сделанных отчетов. Анализы осуществляли с использованием программы SAS версии 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

### **Результаты**

#### **Индивидуумы**

В группу испытания было включено всего 40 индивидуумов. У одного из этих индивидуумов, оценка не могла быть проведена из-за неправильного приготовления АДК. Демографические и клинические характеристики индивидуумов представлены в Таблице 1. Средний возраст индивидуумов составлял 53 года (в пределах 30-73 лет). В это испытание была включена 21 женщина (53,8%). В этом испытании был проведен анализ большого числа опухолей различных типов, причем, наиболее распространенными являются саркома (n=8), рак прямой и ободочной кишки (n=7) и меланома (n=6). Индивидуумы имели в среднем три поражения (в пределах 1-5 поражений). Медианное число проводимых ранее лечений равно двум (среднее=3; в пределах 1-9). Все процедуры проводили с участием амбулаторных больных в соответствии с методами визуализации (компьютерной томографии) или ультразвуковой визуализации), которые были проведены врачом-радиологом путем введения местного наркоза с сохранением сознания. При использовании 2 миллионов доз АДК, 16 индивидуумам вводили в среднем по четыре инъекции (в пределах 1-6 инъекций). При использовании 6 миллионов доз АДК, 20 индивидуумам вводили в среднем по три инъекции (в пределах 2-6 инъекций). При использовании 15 миллионов доз АДК, 3 индивидуумам вводили в среднем по четыре инъекции (в пределах 3-4 инъекций). Инъекцию проводили только в одну опухоль на индивидуума.

АДК вводили вовнутрь опухоли в соответствии с протоколом визуализации в дозе 2 миллионов, 6 миллионов или 15 миллионов живых, активированных, аутологичных ДК на инъекцию. При каждом визите для инъекции (дни 0, 7, 14, а затем недели 8, 16 и 32), делали инъекцию в один участок поражения. В целях приготовления АДК для внутриопухолевой инъекции, эти клетки активировали путем контактирования с БКГ и IFN $\gamma$ . Супернатанты, собранные из активированных ДК, получали для измерения уровня продуцирования цитокинов. Биоптаты опухоли оценивали на некроз опухоли и на инфильтрацию лимфоцитов. Мониторинг размера опухоли проводили в соответствии со стандартными процедурами визуализации, и брали кровь для иммунологического мониторинга.

#### **Безопасность и продолжительность жизни**

Внутриопухолевая инъекция, введенная в соответствии с протоколом визуализации, в основном, хорошо переносилась пациентом и была приемлемой. В целом, i.t.-инъекции были введены 16 индивидуумам в дозе 2 миллиона, 20 индивидуумам в дозе 6 миллионов и 3 индивидуумам в дозе 15 миллионов. Во время увеличения доз, какой-либо дозоограничивающей токсичности (DLT) не наблюдалось, а поэтому, максимально

допустимую дозу (MTD) не определяли. Максимальная тестируемая доза (15 миллионов аДК) хорошо переносилась пациентом. Побочные эффекты, ассоциированные с экспериментальным лечением, представлены в Таблице 2.

**Таблица 2. Побочные эффекты, ассоциированные с лечением.**

5

	Активированные дендритные клетки (аДК/инъекцию)						
	2 миллиона n=16		6 миллионов n=20		15 миллионов n=3		Всего n(%) <sup>b</sup>
Побочный эффект <sup>a</sup>	G1-G2	G3-G4	G1-G2	G3-G4	G1-G2	G3-G4	
Пирексия	15	0	14	0	2	0	31 (79,5)
Озноб	10	0	5	0	1	0	16 (41,0)
Усталость	8	0	2	2	0	0	12 (30,8)
Боль/дискомфорт в участке инъекции	8	0	3	0	0	0	11 (28,2)
Ночные выпоты	5	0	5	0	0	0	10 (25,6)
Снижение аппетита	6	0	2	0	1	0	9 (23,1)
Миалгия	4	0	3	0	0	0	7 (17,9)
Головная боль	3	0	1	0	0	0	4 (10,3)
Тошнота	3	0	0	0	1	0	4 (10,3)
Рвота	3	0	0	0	1	0	4 (10,3)
Анемия	1	0	0	1	0	0	2 (5,1)
Заболевание, напоминающее грипп	1	0	1	0	0	0	2 (5,1)
Боль	0	0	2	0	0	0	2 (5,1)
Потеря массы	0	0	1	0	1	0	2 (5,1)
Абдоминальная боль	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Боль в спине	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Боль в грудной клетке	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Обезвоживание	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Сухой глаз	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Сухой рот	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Одышка	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Отек лица	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Гидронефроз	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Гипокалемия	0	0	0	1	0	0	1 (2,6)
Гипномагнетизация	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Бессонница	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Дискомфорт в скелетно-мышечной области	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Периферический отек	1	0	0	0	0	0	1 (2,6)
Гиперчувствительность кожи	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)
Синдром системного воспалительного ответа	0	0	0	1	0	0	1 (2,6)
Тахикардия	0	0	1	0	0	0	1 (2,6)

Сокращения: аДК - активированные дендритные клетки; степень G (в соответствии с критериями оценки побочных эффектов по общей терминологии, разработанной специалистами Национального института рака, версия 4).

40

<sup>a</sup> При наблюдении побочных эффектов в различные дни в различной степени, указана самая высокая наблюдаемая степень.

<sup>b</sup> Процент от общего числа пациентов, N=39.

45

Побочные эффекты, ассоциированные с лечением, наблюдались у 32 индивидуумов (82,1%), но большинство из них имели степень 1 или 2, и большая часть этих эффектов исчезала по окончании испытаний. Наиболее распространенными побочными эффектами являются пирексия (n=31, 79,5%), озноб (n=16, 41,0%), усталость (n=12, 23,1%), боль или дискомфорт в участке инъекции (n=11, 28,2%), ночные выпоты (n=10, 25,6%), снижение аппетита (n=9, 23,1%) и миалгия (n=7, 17,9%),

При этом, наблюдалось четыре ассоциированных с лечением побочных эффекта 3-й степени (10,3%) и один побочный эффект 4-й степени (2,6%), и все эти эффекты наблюдались при дозе 6 миллионов аДК на инъекцию.

#### **Гистология**

Данные серии биопсий были получены для 28 индивидуумов. В целом, было проведено 104 биопсии. Новые или увеличенные участки некроза наблюдались у 14 индивидуумов, у которых была проведена биопсия (57%). Число новых стромальных лимфоцитов или повышенное число этих лимфоцитов наблюдалось у 14 индивидуумов, у которых была проведена биопсия (50,0%); число новых инфильтрирующих лимфоцитов или повышенное число этих лимфоцитов наблюдалось у 15 индивидуумов, у которых была проведена биопсия (54%); а у 8 индивидуумов, у которых была проведена биопсия, наблюдались и инфильтрирующие и стромальные лимфоциты (29%). Биопсию проводили на неделю 3 и неделю 8, и околоопухолевые или внутриопухолевые Т-клетки, в основном, детектировались через 8 недель после начала лечения. Следовательно, иммунный ответ инициировался приблизительно в этих временных рамках. У некоторых индивидуумов, аккумуляция Т-клеток детектировалась через 2 или 3 недели после первой инъекции. Эти Т-клетки могут индуцировать уже существующий противоопухолевый иммунный ответ, который будет направлен на опухоль после инъекции активированных ДК.

*De novo* или значительное повышение уровня экспрессии PD-L1 наблюдались у 19 из 25 оцениваемых биоптатов опухоли. Среди биопсий, окрашенных на лимфоциты и PD-L1, новые события экспрессии или повышенные уровни экспрессии PD-L1 наблюдались у 9 из 12 индивидуумов с новыми инфильтрирующими Т-клетками или с их повышенным числом и у 11 из 12 индивидуумов с новыми стромальными лимфоцитами или с их повышенным числом. Среди этих индивидуумов, у всех 19 индивидуумов наблюдались новые события экспрессии PD-L1 или повышенные уровни экспрессии PD-L1, а у 14 индивидуумов присутствовали либо околоопухолевые, либо инфильтрирующие лимфоциты.

Если наблюдались инфильтрирующие Т-клетки, то такими клетками были, главным образом, смесь CD4<sup>+</sup>- и CD8<sup>+</sup>-клеток; однако, в некоторых случаях детектировались исключительно либо CD4<sup>+</sup>-, либо CD8<sup>+</sup>-Т-клетки. В некоторых случаях, Т-клетки составляли более, чем 30% от всех клеток в срезе биоптата (см. также фигуру 1А).

Для оценки опухолиассоциированной функции Т-клеток и функции опухоли-инфильтрирующих Т-клеток, был проведен анализ RNAscore на экспрессию IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  на выбранных тканях. Большинство Т-клеток в тестируемых образцах были позитивными по обоим цитокинам (фигуры 1В и 1С), что может указывать на рекрутинг полностью функциональных Т-клеток в опухоль. Были также детектированы тканевые макрофаги, экспрессирующие TNF $\alpha$ .

#### **Уровни цитокинов, продолжительность жизни и стабильное заболевание (СЗ)**

Уровни цитокинов в аДК оценивали до инъекции индивидууму. Поскольку каждая партия аДК была получена от собственных моноцитов индивидуума, то наблюдалась высокая степень вариабельности по уровню цитокинов у различных индивидуумов. Таким образом, через 8 недель оценивали внутренние корреляции между уровнями цитокинов и ассоциации между уровнями цитокинов и базовыми характеристиками, лечебными факторами, продолжительностью жизни и СЗ.

Во время статистических анализов было обнаружено, что у трех индивидуумов наблюдались активированные ДК, которые имели высокие уровни IL-8 и IL-6, но низкие уровни TNF $\alpha$ . Эти индивидуумы соответственно рассматривались как статистические «аутсайдеры». Первым «аутсайдером» был мужчина в возрасте 51 год с меланомой,

входящий в лечебную группу, которой вводили 6 миллионов аДК. У этого индивидуума наблюдалось 5 поражений, и такой индивидуум ранее проходил один курс лечения. Ему вводили три инъекции, он имел СЗ на неделю 8 и умер приблизительно через 9 месяцев после первой инъекции. Вторым «аутсайдером» была женщина в возрасте 59 лет с раком молочной железы, входящая в лечебную группу, которой вводили 6 миллионов аДК. У этой женщины наблюдалось 3 поражения и она ранее проходила восемь курсов лечения. Ей вводили три инъекции, и эта женщина умерла приблизительно через 1 месяц после первой инъекции. Третьим «аутсайдером» был мужчина в возрасте 52 года с раком легких, входящий в лечебную группу, которой вводили 15 миллионов аДК. У этого индивидуума наблюдалось 3 поражения и такой индивидуум ранее проходил пять курсов лечения. Ему вводили три инъекции, он имел ПЗ (прогрессирующее заболевание) на неделю 8 и умер приблизительно через 3,5 месяца после первой инъекции. Все три индивидуума имели высокую опухолевую нагрузку и крайне неблагоприятный прогноз. У этих трех индивидуумов отсутствовали какие-либо другие известные явно выраженные признаки, которые отличали бы их от остальных индивидуумов лечебной группы. Исследовательский анализ аДК, взятых у одного из индивидуумов, позволяет предположить, что очищенные моноциты не могут полностью превращаться в аДК. В последующих анализах, данные, полученные для индивидуумов и рассматриваемые как статистический «выброс», были исключены.

#### **Внутренние корреляции между уровнями цитокинов**

Для оценки качества активации и эффекта цитокинов, продуцируемых аДК, были определены уровни TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40 и IL-12p70. Между различными оцененными цитокинами наблюдался высокий уровень внутренней корреляции. Эти величины коррелировали с исходом лечения (стабильным заболеванием (СЗ) или продолжительностью жизни) в одномерных анализах. Независимо от этого была использована модель возвратной регрессии для оценки относительно предсказуемой мощности критериев и идентификации различных комбинаций исходя из объединенной модели с учетом всех параметров. Коррелированные цитокины были подразделены на три группы. Первая группа включала IL-6, IL-12p40 и в меньшей степени TNF $\alpha$ . Величина Пирсона  $r$  для IL-6 и IL-12p40 равна 0,64 ( $p=0,004$ ). Величина  $r$  для IL-6 и TNF $\alpha$  равна 0,88 ( $p \leq 0,001$ ). Величина  $r$  для IL-8 и IL-12p40 равна 0,641 ( $p < 0,001$ ). Вторая группа включала IL-10 и IL-8. Величина  $r$  для IL-18 и IL-10 равна 0,63 ( $p < 0,001$ ). Третья группа включала IL-12p40 и IL-12p70, которые имели величину  $r$  0,55 ( $p < 0,001$ ). Следует отметить, что непродолжительное время активации для генерирования аДК не является оптимальным для детектирования продуцирования полного комплемента IL-12p70.

#### **Ассоциация между уровнями цитокинов и базовыми характеристиками и лечебными факторами**

Затем оценивали ассоциации между уровнем цитокинов и базовыми характеристиками и лечебными факторами, включая показания, число поражений, ранее проведенное лечение, дозу, число инъекций, возраст, сумму диаметров или наибольший диаметр опухоли (SLD) и абсолютное число лимфоцитов при скрининге (ALC), с помощью регрессионного анализа. При этом наблюдается отрицательная корреляция SLD с уровнями IL-8 ( $R^2=0,20$ ;  $p=0,006$ ), IL-12p40 ( $R^2=0,14$ ;  $p=0,026$ ) и IL-12p70 ( $R^2=0,11$ ;  $p=0,051$ ), и положительная корреляция с уровнями IL-10 ( $R^2=0,023$ ). Также наблюдается положительная корреляция ALC с IL-12p40 ( $R^2=0,26$ ;  $p=0,002$ ). При этом ни SLD, ни ALC не ассоциируются с продолжительностью жизни.

#### **Ассоциации между уровнями цитокинов и продолжительностью жизни**

Уровни цитокинов отдельно включали в модель пропорциональных рисков для того,



чтобы определить, являются ли они прогностическим фактором продолжительности жизни. Одномерный анализ показал, что IL-6 ( $p=0,048$ ), IL-8 ( $p=0,014$ ) и IL-12p40 ( $p=0,016$ ) ассоциируются с продолжительностью жизни. В частности, уровни IL-8,

превышающие  $985 \text{ нг}/10^6$  клеток/день, и уровни IL-12p40, превышающие  $330 \text{ нг}/10^6$  клеток/день, указывали на значительно более высокую общую продолжительность жизни ( $p=0,0022$  и  $p=0,0077$ , соответственно; фигуры 2А и 2В).

Был проведен исследовательский анализ для оценки объединенной модели выделенных пар цитокинов и оценки взаимодействий факторов. Комбинация IL-8 и IL-12p40 ассоциируется с потенциальным членом, характеризующим взаимодействие ( $p=0,020$ ). Объединенная модель взаимодействия показала, что у индивидуумов с высокими величинами IL-8 и IL-12p40, ответ может быть более общим. Этот результат позволяет предположить, что между оценкой активности ДК и исходом лечения может наблюдаться более сложная взаимосвязь.

#### **Ассоциация между уровнем цитокинов и стабильным заболеванием на неделю 8**

Анализ Каплана-Мейера показал, что продолжительность жизни в значительной степени ассоциируется со стабильным заболеванием на неделю 8 ( $p=0,004$ ), фигура 2С); и таким образом, было определено, что маркеры цитокинов ассоциируются с СЗ. Уровни цитокинов отдельно включали в логистическую модель для того, чтобы определить, являются ли они прогностическим фактором для СЗ на неделю 8. Одномерный анализ выявил положительную ассоциацию между СЗ на неделю 8 и TNF $\alpha$  ( $p=0,015$ , фигура 2D), и такая ассоциация была подтверждена в многомерной модели возвратной регрессии ( $p=0,014$ ).

#### **Другие критерии качества ДК**

Инъектированные аДК у 25 индивидуумов анализировали на экспрессию маркеров поверхности. Слабые корреляции между продолжительностью жизни и уровнями экспрессии (средняя интенсивность флуоресценции, деленная на три) антигенов МНС класса I (логранговая  $p$  для тренда= $0,07$ ) и костимулирующей молекулы CD86 (логранговая  $p$  для тренда= $0,1$ ), еще раз подтвердила гипотезу о том, что качество ДК представляет собой первичную драйверную модель исхода лечения индивидуума после внутриопухолевого введения (фигура 2Е и фигура 2F).

Стабилизация заболевания наблюдалась у большего числа индивидуумов, которым были введены аДК, продуцирующие высокие уровни TNF ( $p<0,01$ ). Продолжительность жизни, вероятно, ассоциируется с высокими уровнями продуцирования TNF $\alpha$ , IL-6 и IL-8.

В этом исследовании оценивали безопасность и эффективность активированных аутологичных дендритных клеток (аДК). аДК инъектировали вовнутрь опухоли по схеме лечения индивидуумов с неоперабельной, локально прогрессирующей или метастазирующей солидной опухолью. Индивидуумам вводили 2, 6 или 15 миллионов аДК на инъекцию на недели 0, 1, 2, 8, 16 и 32, или до тех пор, пока не были введены другие аутологичные аДК. При этом, не наблюдались ни DLT, ни MTD. Эти наблюдения соответствуют данным других исследований, проводимых с использованием ДК-вакцин, где не были идентифицированы ни DLT, ни MTD (Butterfield, *Front. Immunol.* 4:454, 2013, Draube *et al.*, *PLoS One* 6:e18801, 2011). Если учесть, что ДК-вакцины содержат аутологичные клетки, то появление ограниченной токсичности не было неожиданным. Ранее уже отмечалось, что доза ДК-вакцины ограничена только числом клеток, которые могут быть экстрагированы в процессе лейкофереза и адаптированы для лечения, и такая доза рассматривается как максимально допустимая доза (Anguille *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 67:731-753, 2015).

Максимальной дозой, вводимой как описано в настоящем изобретении, является доза 15 миллионов аДК на инъекцию, и эта доза хорошо переносится пациентом, однако, эта высокая доза не является необходимой для вырабатывания эффективного Т-клеточного ответа. Один крупномасштабный мета-анализ, проведенный в испытаниях с использованием ДК-вакцины для лечения рака почек и предстательной железы, выявил позитивную корреляцию между дозой и исходом лечения (Draube *et al.*, *PLoS One* 6: e18801, 2011). Однако, некоторые другие исследования показали, что эквивалентные иммунные ответы, наблюдаемые при относительно небольшом количестве ДК, могут быть достигнуты и при меньшем количестве этих клеток, при условии, что ДК будут эффективно достигать дренирующих лимфоузлов (Tel *et al.*, *Cancer Res.* 73:1063-1075, 2013; Aarntzen *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 19:1525-1533, 2013, Verdijk *et al.*, *Expert Opin. Biol. Ther.* 87:865-874, 2008), Celli *et al.*, *Blood* 120:3945-3948, 2012). Относительно небольшое число слабо выраженных побочных эффектов, ассоциированных с лечением, наблюдалось при введении аДК в этом исследовании. Эти побочные эффекты, такие как пирексия, ассоциировались, главным образом, с активацией иммунной системы. Эти результаты, вместе с отсутствием МТД, показали, что аДК представляют собой безопасное средство для лечения солидных опухолей.

Что касается эффективности аДК, то биопсия опухолей, в которые были введены инъекции, показала наличие повышенного некроза и повышенной инфильтрации лимфоцитов, включая хелперные CD4<sup>+</sup>-клетки и CD8<sup>+</sup>-клетки-киллеры. В отдельных случаях, иммунная реактивность наблюдалась как при быстрой, так и при замедленной инфильтрации Т-клеток в биоптатах, взятых у пациента, и при обширном некрозе. Эти наблюдения продемонстрировали снижение размера опухоли (данные не приводятся). Исследования показали, что повышенная инфильтрация и аккумуляция Т-клеток некоторых типов, таких как стромальные лимфоциты и CTL, в опухолях в высокой степени коррелировали с благоприятным исходом лечения некоторых солидных опухолей (Tosolini *et al.*, *Cancer Res.* 71:1263-1271, 2011; Smyth *et al.*, *Adv. Immunol.* 90:1-50, 2006; Clemente *et al.*, *Cancer* 77:1303-1310, 1996). Кроме того, повышение активности PD-L1 наблюдалось в 19 из 25 опухолей, и такое повышение активности указывает на наличие опухолевого ответа на иммунную активацию, а в частности, поскольку биоптаты опухоли, которые оказались позитивными в анализе на Т-клетки, вероятно, имели более высокий уровень экспрессии PD-L1. PD-L1 представляет собой ко-ингибирующую молекулу, продуцируемую в процессе инфильтрации лимфоцитов, которая ингибирует Т-клеточную активность и предупреждает развитие избыточных иммунных реакций; и опухоли, в которых присутствует эта молекула, ускользают от иммунного «надзора» (Ito *et al.*, *Biomed. Res.Int.* 2015:605478, 2015, Anguille *et al.*, *Pharmacol. Rev.* 67:731-753, 2015). Принимая во внимание то, что вышеуказанные данные для PD-L1 были получены от биоптатов опухоли, можно сказать, что наличие экспрессии PD-L1 может служить маркером успешного индуцирования противоопухолевого иммунного ответа, но не индуцирования ингибирования иммунного ответа. В целом, эти результаты со всей очевидностью показали, что аДК стимулируют эффективный Т-клеточный ответ в солидных опухолях.

Эффективное лечение с использованием аДК также необходимо для улучшения прогноза заболевания. Авторами была высказана гипотеза, что механизм выживания ассоциируется с активностью ДК, как было определено по уровню цитокинов, секретируемых аДК. Следовательно, уровни цитокинов в аДК были измерены до их инъекции в опухоли. Было обнаружено, что IL-12p40 в высокой степени ассоциируется с продолжительностью жизни. IL-12p40 представляет собой одну субъединицу

гетеродимерного комплекса IL-12, также обозначаемую IL-12p70. Известно, что IL-12 стимулирует природные клетки-киллеры и зрелые Т-клетки. Также известно, что он стимулирует превращение Т<sub>H</sub>2-клеток в Т<sub>H</sub>1-клетки, обладающие противоопухолевой активностью (Del Vecchio *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 12:4677-4685, 2007). Таким образом, IL-12p40-продуцирующие аДК являются идеальными для приготовления эффективной ДК-вакцины. Кроме того, секреция IL-8 ассоциируется с продолжительностью жизни. В частности, высокий уровень секреции IL-8 указывает на значительное увеличение общей продолжительности жизни. IL-8, в основном, рассматривается как цитокин, негативно коррелирующий с раковым заболеванием. IL-8 стимулирует ангиогенез, пролиферацию клеток и выживаемость клеток; однако, он также стимулирует инфильтрацию иммунных клеток в микроокружение опухоли (Waugh and Wilson, *Clin. Cancer Res.* 14:6735-6741, 2008). В случае БКГ-иммунотерапии, IL-8 ассоциируется с выработыванием противоопухолевого иммунного ответа (de Boer *et al.*, *Urol. Res.* 25: 31-34, 1997). Также вероятно, что локальное введение IL-8-продуцирующих аДК стимулирует инфильтрацию иммунных клеток в опухоль. Кроме того, регрессионная модель показала, что комбинация двух цитокинов позитивно коррелирует с продолжительностью жизни. Это наблюдение показало, что в увеличении продолжительности жизни ключевую роль может играть комбинация IL-8 и IL-12p40 (а возможно и других цитокинов), а не отдельных цитокинов. В настоящее время остается неясным, могут ли секретируемые цитокины, которые, как было показано, коррелируют с продолжительностью жизни, иметь прямое функциональное значение, или служить в качестве точной оценки общей активности ДК. Наблюдаемые ассоциации между исходными параметрами пациента и активностью ДК, как было определено по продуцированию цитокинов, позволяют предположить, что такие факторы, как SLD и ALC, могут служить прогностическими факторами более благоприятного результата терапии на основе ДК у пациентов, хотя величины  $R^2$  позволяют предположить, что эти базовые параметры ответственны только за 25% изменение уровней цитокинов. Эта возможность заслуживает дополнительного внимания в последующих исследованиях с более однородными группами пациентов, и будет предметом дальнейших исследований.

Дополнительный анализ продолжительности жизни пациентов, подвергаемых лечению с использованием ДК, показал, что СЗ на неделю 8 в высокой степени коррелирует с продолжительностью жизни. Эти данные указывают на то, что если опухоль может быть стабилизирована аДК, то шансы на увеличение продолжительности жизни без прогрессирования заболевания значительно возрастают. Таким образом, было определено, что цитокины ассоциируются с СЗ на неделю 8. Анализ уровней цитокинов показал, что TNF $\alpha$  позитивно коррелирует с СЗ на неделю 8. TNF $\alpha$  представляет собой хорошо охарактеризованный цитокин, который в высокой степени ассоциируется с активацией иммунного ответа, включая созревание ДК и примирование, пролиферацию и рекрутинг Т-клеток (Calzascia *et al.*, *J. Clin. Invest.* 117:3833-3845, 2007; van Horssen *et al.*, *Oncologist* 11:397-408, 2006). Исследования с участием человека показали, что изолированная перфузия TNF $\alpha$  в конечности может быть использована для лечения локально прогрессирующих сарком мягких тканей (Eggermont *et al.*, *Lancet Oncol.* 4:429-437, 2006). Кроме того, было показано, что TNF $\alpha$  играет важную роль в выработывании противоопухолевых иммунных ответов у мышей (Calzascia *et al.*, *J. Clin. Invest.* 117:3833-3845, 2007). Наблюдаемая здесь позитивная ассоциация между TNF $\alpha$  соответствует этим результатам. Значительная внутренняя корреляция также наблюдалась между IL-6, IL-8 и IL-12p40, однако, кажущаяся значимость может быть результатом внутренней корреляции между IL-8 и IL-12p40, а не биологически релевантной корреляции.

Альтернативно, это может быть показателем общей активности ДК, как обсуждается выше. Эта гипотеза подтверждается корреляционными трендами между продолжительностью жизни и экспрессией МНС-II и CD86, то есть, важными маркерами созревания ДК, экспрессирующимися на поверхности аДК (Steinman and Banchereau, *Nature* 449:419-426, 2007).

В данном описании было показано, что активированные ДК (аДК) являются безопасным и целесообразным средством для лечения пациентов с солидными опухолями. Были идентифицированы конкретные один или более цитокинов, которые, при их секреции аДК, приводили к стабилизации заболевания, и тем самым к увеличению продолжительности жизни. Исходя из вышеуказанных данных, очевидно, что аДК представляют собой перспективное терапевтическое средство, способствующее увеличению продолжительности жизни пациентов с неоперабельными, локально прогрессирующими или метастазирующими солидными опухолями и не вызывающее существенной токсичности при многих солидных опухолях, и эти аДК могут вырабатывать местные и системные иммунные ответы. Исход лечения, такой как стабилизация заболевания и продолжительность жизни, в высокой степени ассоциируется с оценкой активности ДК, такой как продуцирование цитокинов *in vitro*.

На основании приведенных здесь результатов было обнаружено, что (i) внутриопухолевая (i.t.) инъекция активированных дендритных клеток является безопасной и хорошо переносится пациентами; (ii) исход лечения после i.t.-инъекции активированных ДК коррелирует с активностью ДК, как было определено по уровню продуцирования цитокинов; (iii) отдельные цитокины обнаруживают различные ассоциации с параметрами исхода лечения, что позволяет предположить о наличии сложных корреляций между функцией ДК и возможным терапевтическим эффектом.

Хотя в настоящем изобретении представлены и описаны предпочтительные варианты, однако, очевидно, что в них могут быть внесены различные модификации, не выходящие за рамки существа и объема настоящего изобретения.

#### (57) Формула изобретения

1. Способ определения *in vitro* иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток (DC), где указанный способ включает стадии:

(i) получения активированных дендритных клеток;

(ii) определения относительных количеств интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 8 (IL-8), интерлейкина 12 (IL-12) и/или фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ );

(iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и

(iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового,

где пороговое количество IL-6 составляет от 50 до 200 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-8 составляет от 500 до 2000 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p40 составляет от 75 до 100 нг/10<sup>6</sup> клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p70 составляет от 1 до 3 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; и пороговое количество TNF $\alpha$  составляет от 30 до 70 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа.

2. Способ отбора *in vitro* пациента, отвечающего на введение активированных дендритных клеток, путем определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток, взятых у пациента, где указанный способ включает стадии:

- 5 (i) получения активированных дендритных клеток;
- (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ;
- (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и
- (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет
- 10 низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора пациентов, у которых
- 15 наблюдаются уровни выше порогового, как восприимчивых пациентов,

где пороговое количество IL-6 составляет от 50 до 200 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-8 составляет от 500 до 2000 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p40 составляет от 75 до 100 нг/10<sup>6</sup> клеток/24 часа;

20 пороговое количество IL-12p70 составляет от 1 до 3 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; и пороговое количество TNF $\alpha$  составляет от 30 до 70 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа.

3. Способ отбора *in vitro* пациента, не отвечающего на введение активированных дендритных клеток, путем определения иммунотерапевтической активности композиции активированных дендритных клеток, взятых у пациента, где указанный способ включает

25 стадии:

- (i) получения активированных дендритных клеток;
- (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ;
- (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым
- 30 количеством; и
- (iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую
- 35 иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора пациентов, у которых наблюдаются уровни ниже порогового, как невосприимчивых пациентов,

где пороговое количество IL-6 составляет от 50 до 200 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-8 составляет от 500 до 2000 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p40 составляет от 75 до 100 нг/10<sup>6</sup> клеток/24 часа;

40 пороговое количество IL-12p70 составляет от 1 до 3 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; и пороговое количество TNF $\alpha$  составляет от 30 до 70 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа.

4. Способ отбора *in vitro* агентов для созревания дендритных клеток в целях продуцирования активированных дендритных клеток с повышенной иммунотерапевтической активностью, где указанный способ включает стадии:

45

- (i) получения активированных дендритных клеток путем контактирования незрелых дендритных клеток с тест-агентом для созревания дендритных клеток;

(ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ;  
 (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством; и

(iv) подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет  
 5 низкую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; или подтверждения того, что композиция активированных дендритных клеток имеет высокую иммунотерапевтическую активность, если один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и TNF $\alpha$  имеют уровень выше порогового, и отбора агента для созревания  
 10 дендритных клеток, который индуцирует продуцирование активированных дендритных клеток на уровне выше порогового,

где пороговое количество IL-6 составляет от 50 до 200 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-8 составляет от 500 до 2000 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/  
 15 24 часа; пороговое количество IL-12p40 составляет от 75 до 100 нг/10<sup>6</sup> клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p70 составляет от 1 до 3 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; и пороговое количество TNF $\alpha$  составляет от 30 до 70 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа.

5. Способ повышения *in vitro* иммунотерапевтической активности популяции активированных дендритных клеток (DC), где указанный способ включает стадии:

(i) получения популяции активированных дендритных клеток;  
 (ii) определения относительных количеств IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$ ;  
 (iii) сравнения определенного количества IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  с пороговым количеством;

(iv) подтверждения того, что любой один или любая комбинация и/или все IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  имеют уровень ниже порогового; и

(v) добавления достаточного количества агента, который может индуцировать продуцирование одного или любой комбинации и/или всех IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  активированными ДК до тех пор, пока количество IL-6, IL-8, IL-12 и/или TNF $\alpha$  не будет  
 30 превышать пороговое количество, с получением популяции активированных ДК, обладающих повышенной иммунотерапевтической активностью, где агент определяется способом по п. 4; и

где пороговое количество IL-6 составляет от 50 до 200 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; пороговое количество IL-8 составляет от 500 до 2000 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/  
 35 24 часа; пороговое количество IL-12p40 составляет от 75 до 100 нг/10<sup>6</sup> клеток/24 часа; пороговое количество IL-12p70 составляет от 1 до 3 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа; и пороговое количество TNF $\alpha$  составляет от 30 до 70 нг/10<sup>6</sup> дендритных клеток/24 часа.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где активированные дендритные клетки продуцируют  
 40 приблизительно от 75 до приблизительно 150 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа; приблизительно от 750 до приблизительно 1500 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно от 1 до 3 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа; и по меньшей мере приблизительно от 30 до 70 нг TNF $\alpha$ /1 миллион клеток/24 часа.

7. Способ по п. 6, где активированные дендритные клетки продуцируют  
 45 приблизительно 100 нг IL-6/1 миллион клеток/24 часа, и 1000 нг IL-8/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 100 нг IL-12 p40/1 миллион клеток/24 часа; по меньшей мере приблизительно 2 нг IL-12 p70/1 миллион клеток/24 часа; и по меньшей мере

мере приблизительно 30 нг TNF $\alpha$ .

8. Способ по любому из пп. 1-5, где активированные дендритные клетки получают путем проведения следующих стадий:

- (i) выделения клеточной популяции, содержащей человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), из периферической крови;
- (ii) обогащения клеточной популяции, содержащей человеческие МКПК, человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток;
- (iii) культивирования клеточной популяции, обогащенной человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток, в среде для культивирования тканей, в которую было добавлено эффективное количество агента для дифференцировки дендритных клеток в течение периода времени, достаточного для дифференцировки человеческих моноцитарных предшественников дендритных клеток в незрелые человеческие дендритные клетки;
- (iv) культивирования клеточной популяции, обогащенной незрелыми человеческими дендритными клетками, с эффективным количеством агента для созревания дендритных клеток, в целях активации незрелых человеческих дендритных клеток; и
- (v) выделения и промывки активированных человеческих дендритных клеток.

9. Способ по любому из пп. 1-5, где активированные дендритные клетки получают путем проведения следующих стадий:

- (i) выделения клеточной популяции, содержащей человеческие моноцитарные предшественники дендритных клеток;
- (ii) культивирования клеточной популяции, обогащенной человеческими моноцитарными предшественниками дендритных клеток, в среде для культивирования тканей, в которую было добавлено эффективное количество агента для дифференцировки дендритных клеток в течение периода времени, достаточного для дифференцировки человеческих моноцитарных предшественников дендритных клеток в незрелые человеческие дендритные клетки;
- (iii) культивирования клеточной популяции, обогащенной незрелыми человеческими дендритными клетками, с эффективным количеством агента для созревания дендритных клеток, в целях активации незрелых человеческих дендритных клеток; и
- (iv) выделения и промывки активированных человеческих дендритных клеток.

10. Способ по п. 9, где моноцитарные предшественники дендритных клеток получают из кожи, селезенки, костного мозга, тимуса, лимфоузлов, крови пупочного канатика или периферической крови.

11. Способ по любому из пп. 8-10, где моноцитарные клетки-предшественники дендритных клеток представляют собой неактивированные моноцитарные предшественники дендритных клеток.

12. Способ по п. 8, где моноцитарные предшественники дендритных клеток получают у отдельного индивидуума, подвергаемого лечению.

13. Способ по п. 8, где моноцитарные предшественники дендритных клеток получают у здорового индивидуума, у которого имеется HLA-совместимость с отдельным индивидуумом, подвергаемым лечению.

14. Способ по любому из пп. 8 и 9, где агентом для дифференцировки дендритных клеток является GM-CSF без какого-либо другого цитокина или GM-CSF в комбинации с IL-4, IL-7, IL-13 или IL-15.

15. Способ по любому из пп. 8 и 9, где агентом для созревания дендритных клеток являются инактивированная бацилла Кальметта-Герена (БКГ), интерферон  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), липополисахарид (ЛПС), фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), соединение

имидазохинолина, синтетический двухцепочечный полирибонуклеотид, агонист ловушко-подобного рецептора (TLR), последовательность нуклеиновых кислот, содержащих неметилированные мотивы CpG, которые, как известно, индуцируют созревание дендритных клеток, или любые их комбинации.

5 16. Способ по п. 15, где инактивированная БКГ включает всю БКГ; БКГ, содержащую компоненты клеточных стенок; липоарабидоманнаны, происходящие от БКГ; или компоненты БКГ.

17. Способ по п. 16, где инактивированная БКГ представляет собой термоинактивированную БКГ; БКГ, полученную путем обработки формалином, или  
10 БКГ, полученную путем термоинактивации и обработки формалином.

18. Способ по любому из пп. 15-17, где эффективное количество БКГ составляет приблизительно от  $10^5$  до  $10^7$  к.о.е. на миллилитр среды для культивирования тканей, а эффективное количество IFN $\gamma$  составляет приблизительно от 100 до приблизительно 1000 единиц на миллилитр среды для культивирования тканей.

15 19. Способ по п. 15, где соединением имидазохинолина является соединение имидазохинолин-4-амин.

20. Способ по п. 19, где соединением имидазохинолин-4-амин является 4-амино-2-этоксиметил- $\alpha,\alpha$ -диметил-1H-имидазол[4,5-с]хинолин-1,5-этанол или 1-(2-метилпропил)-1H-имидазо[4,5-с]хинолин-4-амин или их производное.

20 21. Способ по п. 15, где синтетический двухцепочечный полинуклеотид представляет собой поли[I]:поли[C(12)U].

25

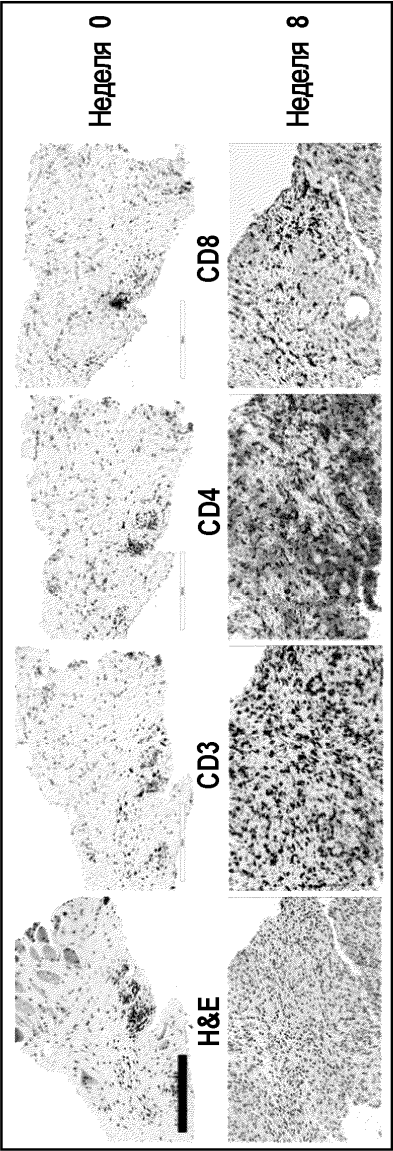
30

35

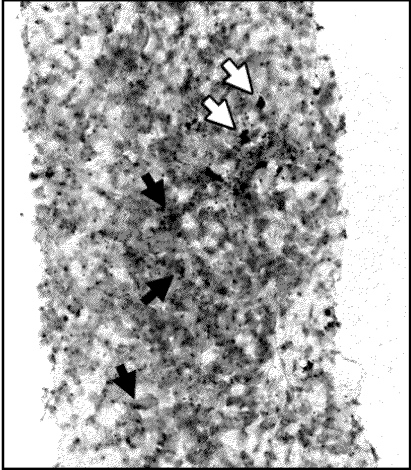
40

45

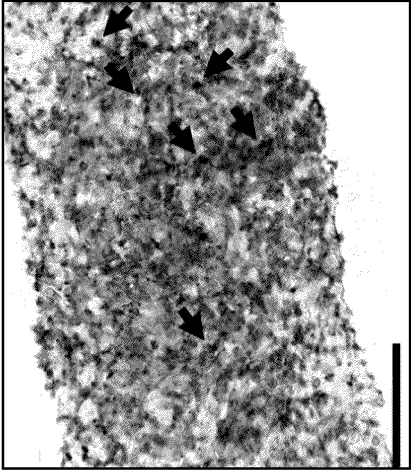




ФИГ.1А

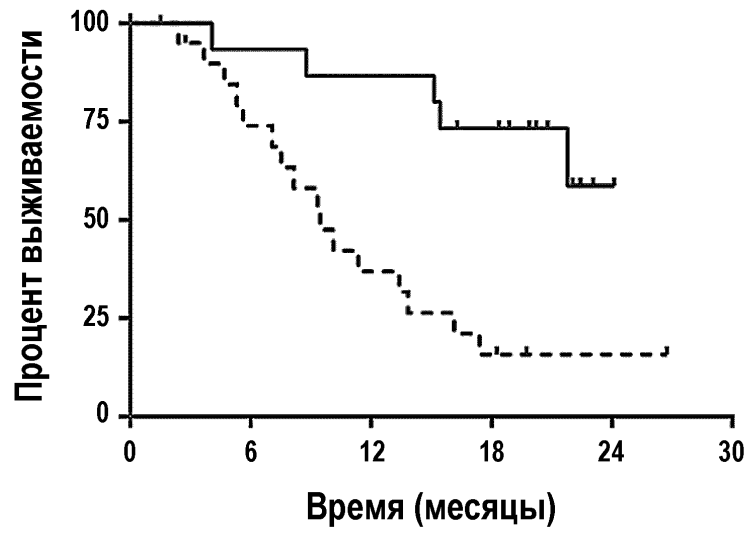


ФИГ.1С

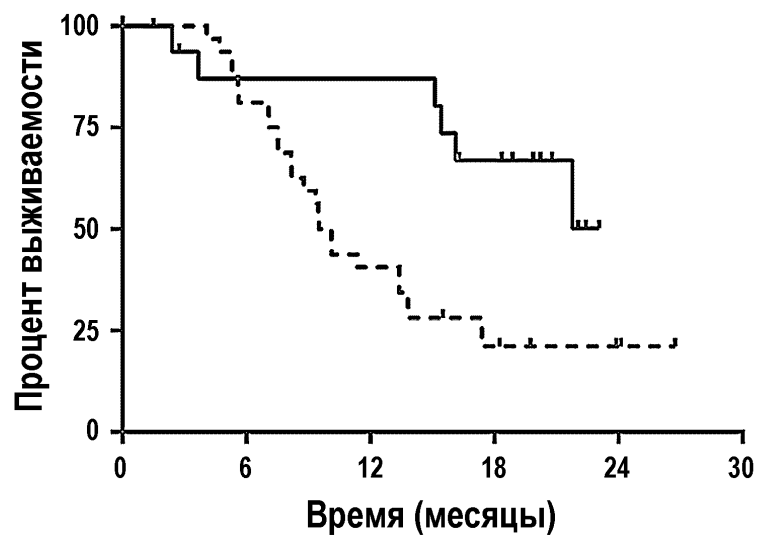


ФИГ.1В

2/5

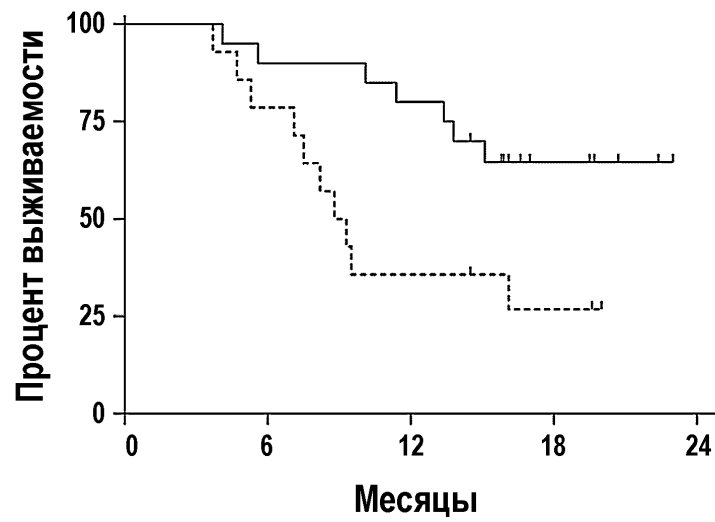


ФИГ.2А

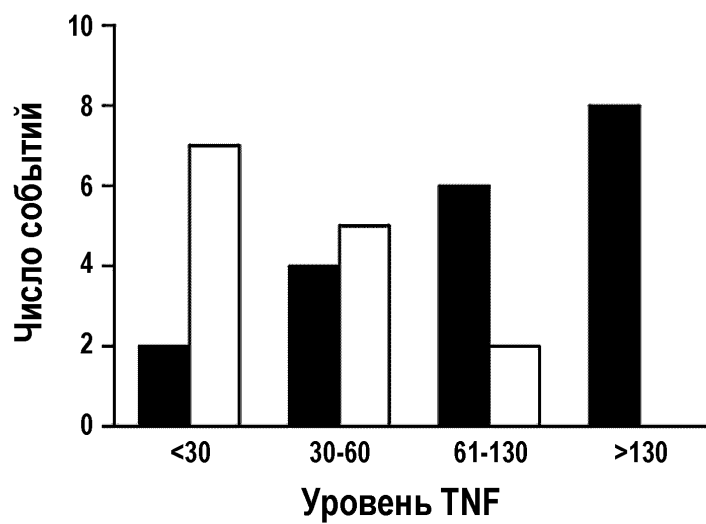


ФИГ.2В

3/5

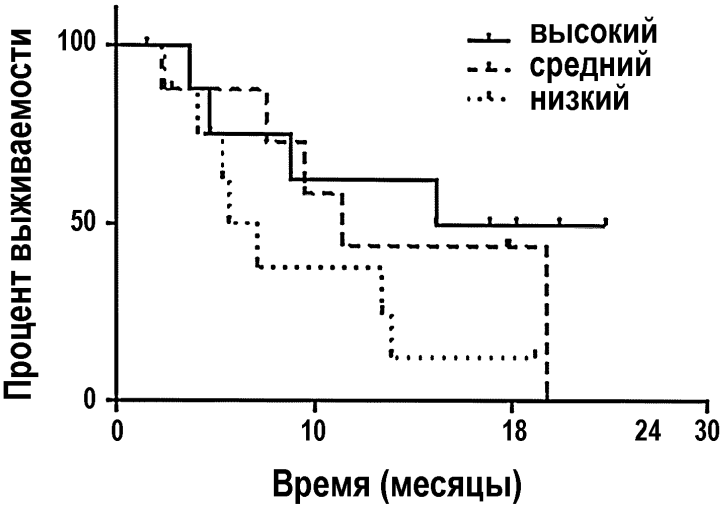


ФИГ.2С

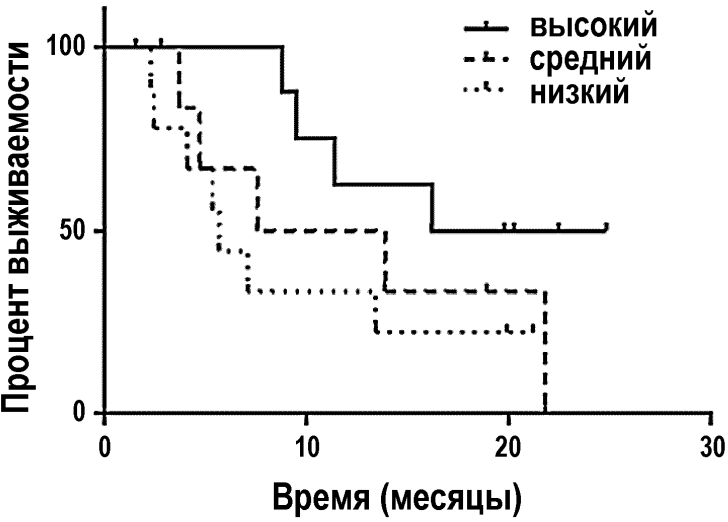


ФИГ.2D

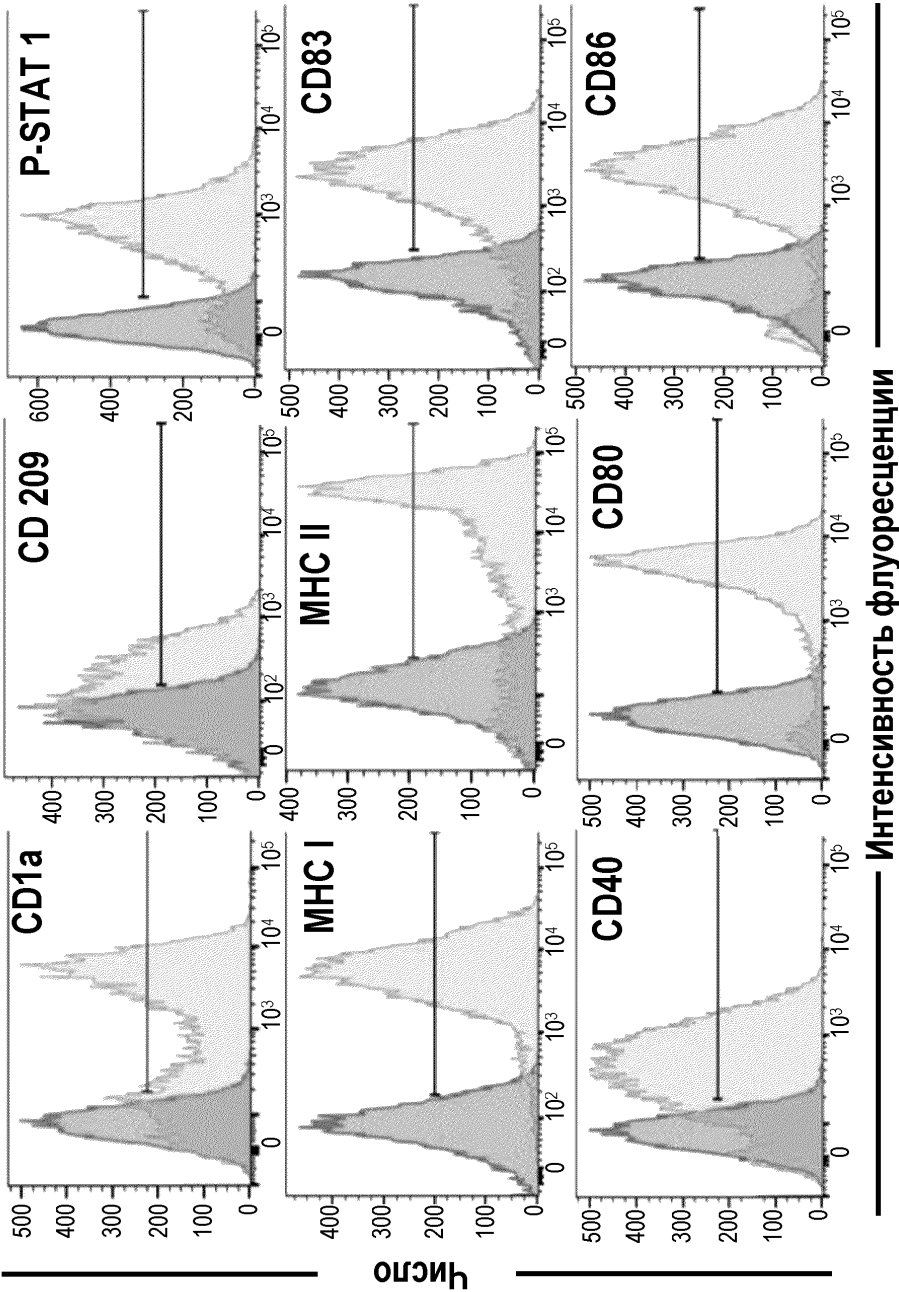
4/5



ФИГ.2Е



ФИГ.2F



Интенсивность флуоресценции

ФИГ.3