

ÖZET

TH1 NİTELİKLERİ VE SİTOLİTİK ÖZELLİKLERİ İFADE EDEN HÜCRELER

- 5 Hem Th1 niteliklerine hem de sitolitik aktiviteye sahip yeni bir hücre türü üretilmiştir. Bu Th1/öldürücü hücreler, periferik kandan saflaştırılan CD4+ hücreleri ve sitotoksik T-hücreler (CTL) ile benzer sitolitik aktivite ile birleşik IFN-gama üretimi gibi Th1 niteliklerine sahip olmaları için işlenmiştir. CTL aktivitesi, normal hücreler hariç hastalıklı hücreleri hedef almaktadır. Th1/öldürücü hücrelerin sitolitik aktivitesi, Granzim B-Perforin mekanizması tarafından yönlendirilmektedir ve hastalıklı hücrelerin apoptotik ölümüyle sonuçlanmaktadır. Th1/öldürücü hücrelerin hastaya allojenik olduğu bir hastaya sitolitik aktivite ile bu Th1/öldürücü hücrelerin uygulanması, Th1/öldürücü hücreler oluşturmak için CD4+ T-hücrelerinin etkinleştirilmesinin, periferik kandan CD4+ hücreleri ayırmayı içeren bu Th1/öldürücü hücrelerin üretilmesinin ve kullanılması yöntemleri.
- 10

İSTEMLER

1. Th1/öldürücü hücrelerin, ekzojen sitokinler eklenmeden, etkinleşmiş hücreler
5 dondurulmadan ve sonra CD3 ve CD28 hücre yüzey moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla
hücreler yeniden etkinleştirilmeden, CD3 ve CD28 hücre yüzey moleküllerinin çapraz
bağlanmasıyla naif CD4+ hücreleri etkinleştirerek elde edilen granzim B ve perforini ifade
eden *ex vivo* etkinleşmiş CD4+ hücrelerinin olduğu, bir tümör hücre çizgisine karşı Th1
nitelikleri ve doğrudan sitolitik aktiviteye sahip etkinleşmiş CD4+ Th1/öldürücü hücreleri
10 içeren bir bileşim.
2. Sitolitik aktivitenin NK nitelikleri içerdiği, istem 1'in bileşimi.
3. Th1/öldürücü hücrelerin IFN-gamayı ifade ettiği, istem 1'in bileşimi.
- 15 4. Th1/öldürücü hücrelerin önemli derecede azaldığı veya IL-4'ün hiç ifadesine sahip
olduğu, istem 1'in bileşimi.
5. Th1/öldürücü hücrelerin sağlıklı donör periferik kandan türediği, istem 1'in bileşimi.
- 20 6. Bileşimin en az yaklaşık 1×10^7 hücreleri içerdiği, istem 1'in bileşimi.
7. Bileşimin en az yaklaşık 1×10^8 hücreleri içerdiği, istem 1'in bileşimi.
- 25 8. Th1/öldürücü hücrelerin sitolitik aktivitesinin belirli bir biçimde sağlıklı donörlerden elde
edilen hücreleri değil, hastalıklı hücreleri etkisizleştirdiği, hastalıklı hücrelerin tercihen
kanseri hücreler, enfeksiyonlu hücreler veya bunların kombinasyonları içerdiği, istem
1'in bileşimi.
- 30 9. Tümör hücre çizgisinin ARH77 olduğu, istem 1'in bileşimi.
10. Bileşimin etkinleşmiş CD4+ Th1/öldürücü hücreler ile hastalıklı hücrelerin doğrudan
etkileşiminin hastalıklı hücrelerin yok olmasına yol açtığı, istemler 1 ile 9'dan herhangi birine
göre, bir bileşimli hastalıklı hücrelerle teması içeren hastalıklı hücrelerin yok olması için bir *in*
35 *vitro* yöntem.
11. Hastalıklı hücrelerin kanserli hücreler, enfeksiyonlu hücreler veya bunların bir

kombinasyonunu içerdđđ, istem 10'un yöntemi.

12. Bileşimin etkili sayııa Th1/öldürücü hücreleri içerdđđ, istem 1 ila 9'dan herhangi birine göre bir hastanın tedavisinde kullanıı için etkinleşmiş CD4+ Th1/öldürücü hücreler içeren bir bileşim.

13. Th1/öldürücü hücrelerin hastaya allojeneik olduğu, istem 12'ye göre kullanıı için bileşim.

TARİFNAME

TH1 NİTELİKLERİ VE SİTOLİTİK ÖZELLİKLERİ İFADE EDEN HÜCRELER

5 ÖNCEKİ TEKNİK

Töropatik kanser aşısı bir çeşit imünoterapidir. İmünoterapi, kanser tedavisi için ilaçların bir çeşidi olarak kemoterapi, radyasyon ve cerrahiye katılmak için ortaya çıkan yeni bir tedavi yaklaşımıdır. İmünoterapi yöntemleri, hastaların tedavi etmek için immün sistemin gücünden yararlanmaya çalışmaktadır. Töropatik aşılama, var olan virüs, tümör ve bakteriyel patojenlere karşı potansiyel olarak iyileştirici bir imünoterapi çeşididir. Töropatik aşılar genel olarak istenen immün yanıtı arttırmak için tasarlanan bir destekleyici ve hedef hastalardan türeyen bir antijen kaynağından oluşmaktadır. Bazı töropatik aşılama protokollerinde, konaktan (otolog) veya bir donörden (allojeneik) türeyen yaşayan immün hücreleri, töropatik aşıların bileşenleridir. Otolog ve allojeneik yaşayan immün hücreleri, örneğin dendritik hücreler, NK hücreleri ve T-hücreleri, kanser tedavisi için imünoterapi protokollerinde kullanılmaktadır.

Lenfositler, omurgalı immün sistemin parçalarıdır ve büyük taneli lenfositleri ve küçük lenfositleri içermektedirler. Büyük taneli lenfositler doğal öldürücü hücreleri (NK hücreleri) içermektedir. Küçük lenfositler T-hücreleri ve B hücrelerinden oluşmaktadır. NK hücreleri, doğuştan gelen immün sistemin parçalarıdır ve viral olarak enfekte hücrelerden ve tümörlerden bir hayvanın savunmada önemli bir rol oynamaktadır. NK hücreleri, çoklu doku uyuşumu kompleksi (MHC) sınıfı II yüzey molekülleri aracılığıyla enfekte olmamış hücrelerden tümör hücrelerini ve enfekte olmuş hücreleri ayırt edebilmektedir. NK hücreleri, enfekte hücreleri veya tümör hücrelerini yoklamak için perforin ve granzim B gibi aktivasyon salınan sitotoksik tanecikleri üzerinde ve sitokinlere yanıt olarak etkinleştirilmektedirler. NK hücreleri, hücre yüzey işaretleyici CD16+ ve CD56+ tarafından karakterize edilmektedir, ancak CD4'ü ifade etmez.

T-hücreleri ve B-hücreleri, uyarılan immün yanıtın parçalarıdır ve kendine yetemeyen antijenleri tanımlar. B-hücreleri, antikor üretimi ile kendine yetemeyen antijene yanıt vermektedir. T-hücrelerinin farklı türleri, farklı yollarda kendine yetemeyen antijenlere yanıt vermektedir. Sitotoksik T-hücreleri (CTL), CD3+, CD8+ ve TCR $\alpha\beta$ ile karakterize edilmektedir ve CD4'ü ifade etmez. Tümöre özgü CD8+ CTLler, ağrı olarak tümör çikartılmasından

sorumludur. Buna ek olarak, CTLler, tümör hücrelerini belirli bir biçimde tanıyabilmektedir ve aynı dokunun normal hücrelerine saldırmaz. CTLler, kanserli veya hastalıklı hücrelerin ölümüne neden olan granzim B ve perforin içeren güçlü enzimlere sahip toksik tanecikler üretmektedir.

5

T yardımcı hücreleri, hücre yüzey işaretleyicileri CD3+, CD4+ ve TCR $\alpha\beta$ ile karakterize edilmektedir. T yardımcı hücreleri, diğer hücreler veya moleküller aracılığıyla immün yanıtı yönlendiren sitokinleri veya diğer molekülleri üretmektedir. T yardımcı hücreler doğrudan hücreleri öldürmeye aracılık olarak bilinmezler ve dolayısıyla granzim B veya perforin gibi sitoksik tanecikleri normal olarak içermezler. T yardımcı hücreler, iki alt sınıfa ayrılmaktadır: T yardımcı tür 1 (Th1) ve T yardımcı tür 2 (Th2). Th1 hücreleri, hücresel bağışıklığa aracılık ederler ve immün-aracılı tümör yok etme için kritiktir, oysa ki Th2 hücreleri sistolik veya antikor bağışıklığına aracılık etmektedirler. Th1 ve Th2 hücreleri, karşıt düzenleyicilerdir, artan Th1 hücreleri Th2 hücrelerini azaltarak düzeltmektedir ve tam tersi aynı şekilde gerçekleşmektedir.

10

15

Çeşitli immunoterapi yöntemleri ve bileşimleri, hastalarda immün yanıtı geliştirmek veya bastırmak için geliştirilmiştir. Hücre terapi yöntemleri, genellikle çoğalma, farklılaşma ve/veya hücrelerin aktivasyonu ve bu hücrelerin terapi olarak bir hastaya transferi gibi *ex-vivo* işlemleri içermektedir.

20

Benimsenmiş immunoterapi, hastadan lenfositlerin çıkarılması, anti-kanser *ex-vivo* aktivitesinin yükseltilmesini, klinik olarak hücrelerin büyük ilgili sayılara çoğaltılması ve sonra hücrelerin hastaya geri dönmesini içermektedir:

25

Benimsenmiş immunoterapide ilk deneyler, bir hastanın kanından lenfositlerin çıkarılması ve bir immün stimülatör olan lenfokin interleukin-2 (IL-2) varlığında onları büyütülmesini içermektedir. Hücreler daha sonra hastaya geri verilmiştir. Bu lenfositler, lenfokin-denetimli öldürücü (LAK) hücreler olarak adlandırılmaktadır.

30

Tümör hücrelerine karşı güçlü bir yanıt, tümörün kendisinden izole edilen lenfositleri kullanarak elde edilmiştir. Bu tümörü infiltre eden lenfositler (TILs), IL-2 varlığında çoğalmaktadır ve tümöre saldırarak geri verilmektedir.

35

Benimsenmiş immunoterapi, *ex vivo* işlemleri hücrelerin vücuda girdiği bir immunoterapi biçimidir.

Ön klinik çalışmalar, anti-tümör aktivitesinin ex vivo denetimli ve genişletilmiş otolog lenfositler ile birlikte interlökin-2 kullanılarak artırıldığını öne sürmüştür. Ayrıca, yüksek doz kapsül interlökin-2 terapi ile birinci amaç yanıtına, limfoperezis ile toplanmış otolog periferik kan lenfositlerinin in vitro aktivasyonu aracılığıyla hazırlanan LAK hücreleri ile birlikte interlökin-2'yi alan hastalarda dikkat edilmiştir ve öncelikli olarak, interlökin-2/LAK'ın kombinasyonunun sadece interlökin-2'ninkinden daha aktif olduğu görülmüştür. IL-2, Th1 yardımcı hücreler ile üretilen bir sitokindir. Benimsenmiş immunoterapinin kullanılması ilgi, klinik çalışmalar, IL-2 ile aktive edilmiş LAK veya TIL hücrelerinin eklenmesinin sadece IL-2 eklenmesinden artıkdaha etkili olduğunu göstermede başarısızolduktan sonra azalmıştır

10

CD4+ T (Th) hücreleri, enfeksiyonlara karşı konak defansının çoğu yönünün aktivasyonu ve düzenlemesi için ve sitotoksik CD8+ lenfositlerin (CTL) yeterli işlevi için çok önemlidir. Tümör bağışıklık bilimindeki çoğu araştırmaya, ağırlıklı olarak CD8+ olan ve melanom ile bazı diğer tümörlerden izole edilebilen otolog tümöre özgü T-hücrelerini doğal olarak oluşturmaya odaklanmıştır. Bu hücreler, in vitro genişleyebilmektedirler ve reinfüze olabilmektedirler. Benimsenmiş immunoterapinin bu türü, hastalığa diğer müdahalelere dayanıklı bazı hastalarda uzun dönemli hayatta kalma ve hedef tümör yanıtıyla sonuçlanmıştır. Benimsenmiş immunoterapi olarak CD8+ sitotoksik T-hücrelerini kullanan kapsamlı bir klinik deneyim olmasına rağmen, zayıf klinik yanıt, hastaların yüksek yüzdelerde tümör reddetmesine ulaşmak için bu terapilerin geliştirilme ihtiyacının üzerinde durmaktadır

20

CD8+ lenfositler, CD4+ T-hücre yardımcı yokluğundan ötürü, büyük ölçüde in vivo işlevselliği sürdürmede başarısız olabilmektedirler. In vitro, CD8+ hücreleri, MHC-uyumlu hücre çizgilerine maruz kalma üzerine interferon- γ (IFN- γ)'nin büyük miktarlarda salgılamaktadır ve otolog antijen-pozitif ve MHC sınıf II-pozitif tümörleri parçalamaktadır. Ancak, tümör hücrelerinin genetik dengesizliği sıkıca CD8+ sitolitik T-hücreleri için doğal olarak güvenilir hedef tümörleri dönüştüren mevcut endojen antijenleri ve işlem yeteneğinin kaybedilmesine yol açmaktadır. Buna ek olarak, CD8+ T-hücreleri, bazı CD4+ T-hücre alt kümelerinde doğuştan görünen bir geniş antitümör yanıtı düzenlemek için içsel yetenekten yoksun görünmektedir.

30

CTL'nin benimsenmiş transferi ile immunoterapiler çoğu hayvan modelinde bir umut vermiştir, bu sonuçların insanlara dönüşümünün zor ve anlaşılabilir olduğu kanıtlanmıştır. CD4+ hücreleri, özellikle Th1'in alt türü, CD8+ öldürücü hücrelere adoptif halde transfer edilen doğal "yardımcı" sağlamak için mevcut immunoterapi armamentariyuma cazip bir ekleme

35

olabilirdi. Ancak, tümöre özgü CD4+ hücrelerini doğal olarak oluşturma ile çalışan önemli bariyerler vardı. Hastaların verilen herhangi bir popülasyonunda CD4+ yardımcı hücreler ile ilişkili sınıf II HLA'nın genetik çeşitliliği, epitoplara tanımlanması ve TCRleri daha fazla problemli yaparak CD8+ sitolitik (öldürücü) T-hücrelerinde bulunan sınıf I HLA durumundan daha karmaşıktı. Buna ek olarak, CD4+ T-hücreleri, CD8+ hücrelerinden in vitro olarak daha az genişlemektedir ve kültür koşullarının nitelikleri önemli derecede etkilemektedir. Son olarak, tümöre özgü CD4+ hücrelerine bağlı olarak gerçekçi hayvan modelleri yetersizdir. Bu faktörler, CD4+ T-hücreleri ve onların klinik kullanımı kullanarak sınıf II dönüştürsel araştırmaya sahipti.

10

Sitolitik tanecikler granzim B ve perforin içeren, Th1 hücreleri (IFN-gama ve IL-4 değil) olarak görev gören ve ötropatik kanser aşısıyla benimsenmiş immün hücre terapi protokollerinde kullanımı için NK-benzeri aktiviteye (normal hücreler hariç, tümör hücrelerini tanımlamakta ve öldürmektedir) sahip klinik olarak ilgili sayıda CD4+ hücrelerinin üretimi için bir yöntem burada açıklanmaktadır.

15

KISA AÇIKLAMA

Hücre-bazlı ötropatik kanser aşısı (hücre sel immunoterapi), kanser tedavisi için yeni minimal olarak toksik bir yaklaşım olarak umut vaat etmektedir. Bu yaklaşıma dair umut, hayvanlarda gösterilmiştir, ancak bu umudu klinik açığa döndürmek zor olmuştur (Bodey, Bodey ve ark. 2000). Birinci hücre sel immunoterapi ilacının yeni FDA onaylı Provenge® (sipuleucel-T), asemptomatik veya minimal olarak semptomatik metastatik kastrat dirençli prostat kanserinin tedavisi için bir otolog dendritik hücre immunoterapisi (Kantoff, Higano ve ark.), klinik uygulama için gelişmiş hücre terapisini iletirmek amacıyla heyecanlanılamamıştır.

20

25

Hayvanlarda gelişmiş hücre sel immunoterapi stratejilerinin immün-aracı anti-tümör mekanizmaları başarılı bir şekilde döndürmenin zor olduğu kanımlandığından dolayı, bunu yerine biz önemli klinik anti-tümör etkileri ortaya çıkardığı bilinen bir anti-tümör immün mekanizmasını döndürmeye odaklandı. Tartışmaya açık bir şekilde, insanlarda açıklanmış en güçlü ve en etkili immün-aracı anti-tümör mekanizması, non miyeloblastik iyileştirme ve HLA-eşlenmiş kök hücre naklinden sonra oluşan nakledilen dokuya karşı tümör (GVT) etkisidir (Barrett and Childs 2000; Childs 2000; Resnick, Shapira ve ark. 2005). Ne yazık ki, bu GVT etkileri, kronik nakledilen dokuya karşı konak hastalık (GVHD) toksisitesi ile beraberdir. Önemli derecede GVT mekanizmasının klinik uygulamasını sağlayan allojeneik hematopoetik

30

35

kök hücre naklinden sonra (Lee, Klein ve ark. 2002), kronik GVHD, ciddi hastalıklı oranla ilişkili ve geç ölüm oranları bir nedenidir.

5 Zararlı GVHD etkilerinden faydalı GVT etkilerinin ayrılması zordur, çünkü etkiler birbiriyle ilişkili ve orantılıdır. GVHD'yi durduran işlemlerde GVT etkilerini de azaltılmaktadır (Li, Giver ve ark. 2009). Birbiriyle ilgili GVT ve GVHD etkilerin bilinen immün-aracıl mekanizmaları analiz ederek, ayrılan GVT/GVHD etkilerinin nakledilen dokudan konağa durumundan konaktan nakledilen dokuya etkisi yönünde ters dönerek immün mekanizmaları ilişkisini sürdürürebilmek yerine bir allojeneik hücrel immunoterapi geliştirmenin olası olabileceği varsayımında bulunulmuştur (Har-Noy and Slavin 2008). Etkilerin yönünün başarıya geri dönüşü, bir toksik olmayan konağa karşı nakledilen doku (HVG) ret etkisine birleşmiş bir konağa karşı tümör (HVT) etkisiyle sonuçlanacaktır.

15 Yüksek yoğunluk CD40L'yi ifade etmiş ve interferonun (IFN)- γ yüksek miktarları üreten kasıtlı olarak uyumsuz, etkinleşmiş, allojeneik Th1 hücrelerinin birleşmiş HVT/HVG etkilerini ortaya çıkarabilecekti. Bu hipotez, kemoterapiye dayanıklı B-hücresi lösemi/lenfoma hayvan modelinde test edilmiştir (Har-Noy, Zeira ve ark. 2008). Bu çalışmalar, Th1 hücreleri etkinleştirildiğinde ve anti-CD3/anti-CD28 kaplanmış mikrobuncuklara bağlanıp uygulandığında, önemli HVT/HVG aktivitesinin ex-vivo farklılaştıran allojeneik Th1 hücreleri tarafından ortaya konulabildiğini göstermiştir. Ek çalışmalar, sistemik dominant Th2 bağışıklığına dominant Th1 bağışıklığı ile değiştirebilir bu allojeneik CD3/CD28-çapraz bağli Th1 hücrelerinin hem bağışıklık sistemini düzenleyici etkilere sahip olduğunu ve hem de Th1'e özgü bağışıklık gelişmesini arttırmak ve tümör bağışıklık kurtarma mekanizmaları bozukluğu için destekleyici etkileri göstermiştir (Har-Noy, Zeira ve ark. 2009). Bu verilerden 25 ötürü, Th1 allograftın insan versiyonu, bu deneysel yaklaşım klinik yaklaşıma dönüştürme olasılığı için incelenmiştir.

Bu hücreleri insan klinik araştırmalarda kullanmak için, üstesinden gelmede gerekli allojeneik Th1 hücrelerinin ex vivo genişlemesi ve farklılaşması ile ilişkili önemli düzenleyici ve 30 lojistik endişeler vardır. Bir endişe, fare Th1 hücrelerinin ex vivo farklılaşmasında neden olacak dış kökenli sitokinler, IL-2, IL-12 ve anti-IL-4 mAb'nin kullanılması gerektiren allojeneik Th1 hücrelerinin fare versiyonlarıdır. Mevcut buluş, bir insan biyolojik ilaç olarak sınıflandırma için partiden partiye kimlik tutarlı ve fonksiyonel özelliklerle sonuçlanan dış kökenli sitokinlerin kullanılmadan insan allojeneik Th1 hücrelerinin üretimi için bir GMP-uyumlu 35 işlemin başarıyla gelişimini açıklamaktadır. Sonuçlanan hücrelerinin karakterizasyonu üzerine,

insan üretim süreci beklenmeyen bir bulgu ile sonuçlanmıştır. Burada açıklanan yöntemler ile üretilen allojeneik Th1 hücreleri sadece Th1 niteliklerini geliştirmemiş, aynı zamanda NK-benzeri nitelikleri de geliştirmiştir. Th1 ve NK-benzeri aktivitenin bir birleşimi ile bir alogreft benzersizdir ve normal kan dolaşımında açığa çıkmaz. Burada açıklanan yöntemler, saflaştırılmış ex-vivo kültürünü, karışık bellek ve naif fenotip (CD45RA ve CD45RO, sıklıkla) ile (CD25-), CD4+ T-hücrelerinin dinlenmesini içermektedir. Hücreler, ekzojen sitokinlerin yokluğunda hareketsiz anti-CD3/anti-CD28 mAbs ile çok kez etkinleştirilmektedir. Hücreler 9 gün sonra 25-100-kat genişlemektedir ve CD4+, CD45RO+, CD25+, CD62^{hi} hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu araç hücre, yalnızca sınırlı azot içinde saklanabilmektedir. Hasta uygulaması için gerekli olduğunda, haberci hücreler CD3/CD28 mAb kaplanmış mikrobuncuklar ile 4 saat inkübe edilmektedir. Bu son 4 saatlik inkübasyon boyunca, haberci hücreler CD62L ifadesini azaltmak ve CD40L ile CD25 ifadesini arttırmak için farklılaşmaktadır. Son CD4+, CD45RO+, CD40L^{hi}, CD62L^{lo}, CD25+ hücreleri, >1000pg/10⁶ IFN-gama hücrelerini ve IL-4 <50pg/10⁶ (Th1 fenotipi) hücrelerini üretmektedir ve granzim B ve perforinin sitolitik taneciklerini ifade etmektedir ve normal hücreler hariç tümör hücrelerini parçalama yeteneği ile NK-benzeri aktivite göstermektedir.

ŞEKİLLERİN KISA AÇIKLAMASI

Şekil 1A ve Şekil 1B, sıklıkla CD4+ seçiminden önce ve sonra hücre fenotipini gösteren CD4 yüzey antijeninin immünohistokimyasal boyamasından akış sitometrisi çizimleridir. Şekil 2A, dinlenen CD4 naif (CD4, CD45RA) hücreleri olarak kaynak hücrelerin fenotipini gösteren akış sitometrisi çizimlerinin bir serisidir. Şekil 2B, etkinleştirilmiş CD4 bellek hücrelerinin (CD4, CD45RO ve CD25) kültüründen sonra fenotipteki değişimi gösteren akış sitometrisi çizimlerinin bir serisidir. Şekil 3, etkinleşme öncesi CAC'de ve etkinleşme sonrası CFB'de yüksekten düşüğe CD62L ifadesindeki kaymayla gösteren bir akış sitometrisi çizimidir. Şekiller 4A-4C, CFB'de CD40L artan ifadesini sıklıkla gösteren CD4+ hücrelerindeki CAC ve CFB'deki CD40L ifade modelinin çizimleridir. Şekil 5, doğrudan öldürme analiz grafiğidir ve tümör hücre çizgisi ARH77'den, CFB'nin öldürebildiği hücreleri göstermektedir. Şekil 6A, CAC tarafından Granzim B ifadesinin bir çizimidir. Şekil 6B, CFB tarafından Granzim B ifadesinin bir çizimidir. Şekil 6C, CFB'de Perforinin tayinin gösteren bir western blot'ın resmi. Şekil 7, EGTA varlığında ve yokluğunda, perforin-Granzim B aktivitesinin bir grafiğidir.

GÖRSEL YAPILANDIRMALARIN AYRINTILI AÇIKLAMASI

Bu açıklama, benzersiz niteliklere sahip hücreleri içeren bileşimlerle ilgilidir. Bileşim, hem Th1 yardımcı hücre özellikleri hem de sitolitik tanecikler ve NK aktivitesine sahip bir hücre türünün hücrelerini içermektedir. CD4+ T-hücreleri ile Th1 ve NK niteliklerinin birleşimi, çeşitli hastalara sahip hastalar için önemli oranda töropatik yararlıklar sağlayabilmektedir. Th1 nitelikleri, örneğin, IL-4 üretimi olmadan IFN-gama üretimini içerebilmektedir. NK nitelikleri, Granzim B ve perforin ifadesini faydalı hale getiren normal hücreler hariç tümör hücrelerinin ölümünü içerebilmektedir. Özellikle, buluş, Th1 niteliklerine sahip etkinleştirilmiş CD4+ Th1/öldürücü hücreleri ve daha sonra istem 1 ile tanımlanmış gibi bir tümör hücresine karşı doğrudan sitolitik aktiviteden oluşan bir bileşim sağlamaktadır.

Benimsenmiş imünoterapi için, bu yeni hücre türünün klinik olarak ilgili sayılara farklılaşması ve genişlemesine neden olan yöntemler burada açıklanmaktadır. Periferik kan veya diğer T-hücrelerinin kaynaklarından, belirli bir biçimde CD4+ T-hücrelerinden ayrılmış T-hücreleri ayırmayı içerebilen yeni hücrelerin türetilmesi yöntemleri. Bu CD4+ T-hücreleri, farklılaşabilmektedir ve imünoterapi için kullanılan ve burada açıklanan yöntemlere göre klinik olarak ilgili sayılara genişleyebilmektedir. Süpriz bir şekilde, bu yöntemlere göre hazırlanan CD4+ T-hücreleri, NK/CTL hücrelerinde genel olarak bulunan sitolitik aktiviteye benzer sitolitik aktivite gösterebilmektedir ve ayrıca Th1 nitelikleri ile aktivitesi sunmaktadır.

Genel olarak, T yardımcı hücreler doğrudan sitolitik aktivite göstermezler ancak hastalar hücreleri etkisizleştirmek için NK hücreleri ve CTLler gibi diğer hücreleri daha sonra ortaya çıkaran sitokinleri ve diğer faktörleri üretmektedir. Mevcut bileşimlerde CD4+ T-hücreleri hastalar hücreleri doğrudan öldürebilmektedir hatta daha sonra sitolitik aktivite yürüten NK hücreleri gibi diğer hücreleri uyarmak için sitokinleri üretebilmektedir. Bu CD4+ T-hücrelerinin sitolitik aktivitesi, tümör veya enfekte olmuş hücrelerin öldürülmesiyle sonuçlanan Granzim B ve perforin vasıtasıyla yönlendirilmektedir.

Burada ifade edildiği gibi sitolitik aktivite, hedef hücreler ile etkileşime geçtiğinde hedef tümör hücreleri veya hücre çizgilerinin etkileyici hücreleri tarafından doğrudan öldürmeyle ilgilidir. Doğrudan öldürme, diğer hücre türlerinin varlığı olmadan sadece etkileyici ve hedef hücrelerin varlığında meydana gelebilmektedir.

Mevcut buluşta açılan yeni hücre türü, Th1/öldürücü hücreler olarak burada ifade edilecektir. Th1/öldürücü hücreler, normal hücreler hariç tümör hücrelerini öldürerek Th1 niteliklerinin bir birleşimini ve Granzim B ile perforin ifadesinin bir mekanizmasıyla NK aktivitesinin ifadesini gösterebilmektedir.

5

Burada ifade edildiği gibi klinik olarak ilgili hücre sayılarına doğrudan ya da doğrudan olmayarak bir anti-tümör etkisini ortaya çıkarmak için Th1/öldürücü hücrelerin yeterli sayısıyla ilgilidir. Genel olarak uygulanan Th1/öldürücü hücre sayılarına tek bir dozda en az 1×10^6 hücredir, tercihen en az 1×10^7 hücredir ve daha tercihen en az 1×10^8 hücredir. Yüksek miktarlarda hücreler ile dozlar, buluşun kapsamıdadır. Tercihen, yeterli miktardaki hücre, birkaç hasta için yeterli doz üretmek için tek bir kan donöründen üretilmektedir. Klinik olarak ilgili sayılar, en az bir hasta için, daha tercihen 10 hasta için ve en çok tercihen 100 hasta için yeterli hücreyi içermektedir.

10

15

Mevcut buluşun bileşimleri, çeşitli hastalıklı hücrelere sahip bir hastaya uygulanabilmektedir. Hasta bir hayvan, insan veya diğer memeliler olabilmektedir. Hastalıklı hücreler, enfekte edilmiş dokudaki hücreler veya kanserli hücreler olabilmektedir. Hastalıklı hücreler, virüsler ve/veya bakteriyel patojenler ile enfekte edilebilmektedir. Bileşimler, meme kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri, mide kanseri, pankreas kanseri ve benzerleri gibi solid tümörlü hastalara uygulanabilmektedir. Bileşimler, hematolojik kötü tümörlü (örn., kronik lenfatik lösemi, multipl miyelom ve Hodgkin dışı lenfomalar) veya viral enfeksiyonlu hastalar (örn., hepatit B veya C, herpes, HIV) veya diğer bozukluklara sahip hastalara da uygulanabilmektedir.

20

25

Burada açılan bileşimler, canlı hücrelerdir. >%70 hücrelerin, tripan mavisi ekstrüzyonu, MTT gibi uygun analiz teknikleri veya uygun koşullar altında hücrelerin genişleme, farklılaşma ve/veya etkinleşme gibi *ex vivo* değişimler yapabilmesi şeklinde ATP seviyelerinin dirimsel ölçümlerle dayan tayin ile canlı hücreler tarafından belirlendiği gibi canlı oldukları anlamına gelmektedir. Ancak bileşimler, bazı etkinleşmeyen hücreleri, ölmüş hücreleri ve/veya cansız hücreleri ve yaşamayan bileşimleri içerebilmektedir.

30

Bileşim genel olarak örneğin bir donörün kanından türeyen CD4+ hücrelerini içermektedir. Donör hastalıklı veya normal olabilmektedir. CD4+ hücreleri, burada anlatıldığı şekilde işlenebilmektedir ve aynı donöre veya ilgili ya da ilgisiz bir alana infüzyon için daha sonra formülize edilmektedir.

35

CD4+ kaynak hücreleri, tercihen periferik kandan saflaştırılmaktadır. CD4 hücreleri, çeşitli yollarla saflaştırılabilmektedir. Genel olarak, CD4+ hücreleri, pozitif seçim ile periferik kan beyaz kan hücrelerinin bir tabakasından saflaştırılmaktadır. Beyaz kan hücrelerinin bir tabakasından CD4+'nın pozitif seçimi, örneğin, Miltenyi Biotec (Auburn, CA)'ten elde edilen manyetik boncuklar ve kolonlar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu, hücre bileşiminin yaklaşık yüzde 90'dan, tercihen yaklaşık yüzde 95'ten ve daha fazla tercihen yaklaşık yüzde 98 saf CD4+ hücreleri olan bir hücre bileşimiyle sonuçlanmaktadır.

- 10 Beyaz kan hücrelerinin bir tabakasından izole edilen ve Th1/öldürücü hücrelerin üretimi için kaynak malzeme olarak kullanılan CD4+ hücreleri, birçok hücre yüzey işaretleyicinin ifadesi ile karakterize edilebilmektedir. Periferik kan beyaz kan hücrelerinin bir tabakasından saflaştırılan CD4+ hücrelerinin popülasyonu, CD45RA/CD45RO işaretleyicilerinin karışık bir popülasyonuna sahip olabilmektedir. CD4+ T-hücreleri, genelde ağaç olarak CD25-'tir.
- 15 Tercihen, kaynak CD4+ hücreleri çoğunlukla naiftir (CD45RO'yu değil CD45RA'yı ifade etmektedir). Kaynak CD4+ T-hücreleri, CD62L ifadesi ve CD40L ifadesi için değerlendirilebilmektedir. Genel olarak, kaynak CD4+ T-hücreleri çok düşük miktarlarda CD40L ifade etmektedir. CD62L'nin ifadesi, bir çift modlu (yüksek ve düşük) ortalama floresan yoğunluk piki olabilmektedir. Kaynak CD4+ hücreler tercihen yüksek bir CD62L ifadesine sahiptir.
- 20

- Kaynak, çoklu etkinleşme adımları ile Th1/öldürücü hücrelerine farklılaşmak için işlenebilmektedir. Tercihen CD4+ hücreleri, 9 gün için her üç günde etkinleştirilmektedir. Bu CD4+ hücreleri, CD3 ve CD28 hücre yüzey moleküllerinin çapraz bağlanmasıyla etkinleştirilmektedir. CD3 ve CD28'in çapraz bağlanması hareketsiz anti-CD3 ve CD28 monoklonal antikorların eklenmesiyle başarılabilmektedir. Genel olarak, Th1/öldürücü hücreler, hücre kültüründe farklılaşma ve genişleme ile elde edilmektedir. Çoklu etkinleşmiş CD4+ hücreleri, hücre kültüründen toplanabilmektedir ve sıvı azotta dondurulmuş halde saklanabilmektedir. Bir hastaya uygulanmadan önce, hücreler son bir zaman etkinleştirilmektedirler. Etkinleştiren madde, hücreler ile ilişkili soldad Bağlı etkinleştiren madde ile hücreler, infüzyon veya enjeksiyon için uygun bir şırınga gibi bir cihazda formüle edilmektedir. Burada kullanılan gibi "etkinleşme" maddeler tarafından monoklonal antikorlar gibi hem hücre yüzey moleküllerinin bağlanması hem de çapraz bağlama maddeleri ile bu maddelerin çapraz bağlanması ifade etmektedir. Bu tür bir etkinleşme, örneğin, U.S. Patent
- 30
- 35 No. 7,435,592 ve U.S. Patent No. 7,402,431'de açıklanmaktadır.

CD4+ T-hücreleri, T-hücresi yüzey molekülleri için hareketsiz monoklonal antikorları kullanılarak çeren çeşitli yollarla etkinleştirebilmektedir. Uygun etkinleşmiş T-hücreleri, örneğin, U.S. Patent No. 7,435,592'de açıklanmaktadır. Hücreler tercihen monoklonal antikorlar veya sonradan çapraz bağlanan diğer bağlayıcı maddeler tarafından bağlanan hücre yüzey kısımlarına sahiptir. Bu monoklonal antikorlar ve/veya bağlayıcı maddeler, tercihen, bir madde ile çapraz bağlanır. Örneğin, T-hücreleri etkinleştirmek için solid bir yüzeyde hareketsiz kalmaktadırlar. Bunlar, kültüre (CAC) etkinleştirilen hücreler olarak burada ifade edilmektedir. Bu *ex vivo* hazırlanan CAC, gelecek için dondurulabilmektedir ve infüzyon için formüle edilebilmektedir. CAC, örneğin, sıvı bölüntüler olabilmektedir ve sıvı azot tanklarına gaz fazında dondurulabilmektedir. CAC, aşağıda açıklanmış gibi fonksiyonel salınım kriterleri ve önceden tanımlanmış kimliği uyumlu bir şekilde karşılayabilmektedir. İşlemi devam eden ve son kalite kontrol testlerinde, sterillik ve endotoksinsiz durumu garanti etmek için kurulmaktadır.

Bir örnekleyici yapılandırılarda, CD4+ T-hücreleri Invitrogen, Carlsbad, CA'dan elde edilen CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads varlığında 9 gün kültürlenmektedir. Hücreler, 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında Life Cell Şişelerinde (Baxter Scientific, Deerfield, IL) çoğaltılır ve kültürün 3 ila 6. gününde boncuklar ile yeniden uyarılır. Kültürde 9 günden sonra, boncuklar çıkartılabilmektedir ve hücreler CAC olarak ifade edilebilmektedir. Etkinleşme için hücrelerin kültürlenmesinin diğer yöntemleri, buluşun kapsamındadır.

Tercih edilen yapılandırmalarda, *ex vivo* hazırlanan CAC, hasta uygulaması veya diğer kullanımlar için gerekli olana kadar dondurulup saklanmaktadır. Hastaya uygulama öncesi, CAC çözülmemektedir, eğer gerekirse yıklanmaktadır ve örneğin U.S. Patent No. 7,402,431'de açıklanmış gibi CD3 ve CD28 gibi hücre yüzeyi bağlayıcı kısımların çapraz bağlanmasıyla besin olan ortamda yeniden etkinleştirilmektedir. Etkinleşme ve çapraz bağlama maddeleri ile birlikte CAC, daha sonra yıklanabilmektedir ve bir formülasyon tamponu gibi bir besleyici olmayan tampona transfer edilebilmektedir. Formülasyon tamponunda yeniden aktifleştirilmiş hücreler, formülasyon tamponundaki (CFB) hücreler olarak burada ifade edilmektedir. CFB, Th1/öldürücü hücreler olarak da ifade edilebilmektedirler. CFB ve Th1/öldürücü hücreleri, burada değiştirilebilir bir biçimde kullanılabilmektedir.

Th1/öldürücü hücreler, bir şırıngada veya diğer uygun kaplarda ambalajlanabilmektedir ve eğer gerekirse bir bakım bölgesi noktasına transfer edilebilmektedir. Th1/öldürücü hücreleri,

töropatik amaçlar için hastaya sonradan uygulanabilmektedir. Th1/öldürücü hücreleri, intravenöz, intraperitoneal olarak, intradermal olarak veya diğer uygun yöntemler ile uygulanabilmektedir. Th1/öldürücü hücreler, besleyici olmayan tampona transfer edildiğinde sınırlı bir saklama ömrüne sahiptirler. Hücreler, her ml için en az yaklaşık 10^6 hücre yoğunluğunda, tercihen her ml ya da daha fazlası için yaklaşık 10^7 hücre yoğunluğunda formülize edilebilmektedirler. Bazı yapılandırmalarda, hücreler, her ml veya daha fazlası için yaklaşık 10^8 hücre yoğunluğunda formülize edilebilmektedirler. Hücrelerin özel konsantrasyonu, terapi protokolünün ve hücrelerin özel kullanımı ile belirlenebilmektedir.

Bileşim, Th1/öldürücü hücrelere ek olarak birden fazla diğer bileşeni içerebilmektedir. Bu bileşenler, örneğin, istenen etkileşme seviyesinde hücreleri koruyan maddeleri içerebilmektedir. Örnekleyici bir yapılandırmada, bileşim, Örneklerde aşağıda açıklanan Dynabeads ClinExVivo™ gibi etkileşme seviyesinde T-hücreleri koruyan maddeleri içerebilmektedir.

Genel olarak, hücreler, bir hastaya infüzyon için uygun besleyici olmayan tampona transfer edilmektedir. Hücreler, çeşitli besleyici olmayan tamponlar olabilmektedirler. Burada ifade edildiği gibi besleyici olmayan tampon, herhangi tür bir ortam, hücrel çoğalma ve/veya genişlemeyi desteklemek için uygun bileşenlerden yoksun tampon veya diğer sınırlı Besleyici olmayan tamponlar genel olarak izotonik, USP steril ve pirojensizdirler ve canlı hücre sağlamlığını korumak için uygun bileşenleri ve/veya tamponlama sistemini içermektedir ve insan parenteral kullanımı için lisanslıdır. Bir örnek yapılandırmada, besleyici olmayan tampon, %1 insan serum albümin ile Plazmalit A (Baxter Scientific, Deerfield, IL) olan bir formülasyon tamponudur. (McKesson, San Francisco, California)

Th1/öldürücü hücreler ile yapılandırmalarda, hücreler için etkinleşme sinyalleri, hücreler besleyici olmayan tampona transfer edildiğinde dahi korunmaktadır. Örneğin, hücrelerin hücre yüzeyi bağlayıcı moleküllerini çapraz bağlayarak etkinleştirildiği yapılandırmalarda, çapraz bağlama besleyici olmayan tamponda tercihen korunmaktadır. Depolama boyunca çapraz bağlamanın korunması depolamadan çıkartıldıktan sonra bileşimin fonksiyonel niteliklerini onarmada kritik olabilmektedir.

Bileşimdeki Th1/öldürücü hücreler, fonksiyonel niteliklerin yeni bir birleşimini sunabilmektedir. Bu fonksiyonlar, NK fonksiyonları ile benzer olan Th1 niteliklerini ve sitolitik fonksiyonları içermektedir. Th1/öldürücü hücreler genel olarak, IFN-gama üretmektedirler ve

önemli oranda azalmışlardır ya da hiç IL-4 üretmemişlerdir. Tercihen, IL-4 üretimi 50pg/10⁶ hücrelerinin altındadır ve IFN-gama üretimi 1000pg/10⁶ hücreden daha fazladır.

Th1/öldürücü hücrelerin ek fonksiyonel nitelikleri, örneğin, CD40L, FasL, perforin ve granzim B, yardımcı uyaran moleküller 4-1BBL, CD28, CTLA4 ve TNF ile ilgili etkilene kaynağı sitokin (TRANCE), TWEAK, PD-1, B7 ailesi, integrinler, kaderinler ve selektinler gibi fonksiyonel moleküllerin ifadesini ve çeşitli sitokinler ve kemokinlerin salgılanması ve bu sitokinler ve kemokinler için reseptörlerin ifadesini içerebilmektedir. Th1/öldürücü hücreler, büyük miktarlarda sitokin üretebilmektedir ve salgılayabilmektedir. Üretilen sitokinler, örneğin, sadece kalıtsal IL4 salgılayan IFN α , GM-CSF ve TNF- α olabilmektedir.

Burada açılan Th1/öldürücü hücreler, sitolitik aktivite gösterebilmektedirler. Sitolitik aktivite CTL/NK hücrelerinin niteliklerine benzerdir. Genel olarak, CTL/NK hücrelerinin sitolitik aktivitesi, hatta Th1/öldürücü hücreler, normal hücreler hariç tümör veya hastalıklı hücreler için özeldir. Bir başka ifadeyle, Th1/öldürücü hücreler, normal hücreler hariç hastalıklı hücreleri öldürebilmektedir. Sitolitik aktivite, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla oluşabilmektedir. Sitolitik aktivite, örneğin, Granzim B-Perforin mekanizması aracılığıyla oluşabilmektedir. Sitolitik aktivite, sitoliz veya apoptoz ile hücrelerin yok etme yol açabilmektedir. Th1/öldürücü hücrelerinin sitolitik aktivitesi, EGTA tarafından engellenebilmektedir. Yaklaşık 1 mM'de EGTA konsantrasyonu, örneğin, etkinleşen Th1 hücrelerinin sitolitik aktivitesini azaltabilmektedir.

Mevcut buluşun Th1/öldürücü hücreleri, Granzim B ve Perforin moleküllerini ifade etmektedir. Granzim B ve Perforin, farklılaşma, etkilene ve benzerleri ile olgunlaşmadan sonra veya naif olup olmadıkları genel olarak CD4+ T-hücrelerinde ifade edilmez. Etkilenmiş Th1 hücrelerindeki Granzim B ve perforin miktarı değişebilmektedir. Genel olarak, ifade edilen Granzim B ve Perforin miktarı hastalıklı hücreleri yok etmek için yeterlidir.

Mevcut buluş, Th1/öldürücü hücreleri içeren bileşimleri kapsamaktadır Th1/öldürücü hücreler, ARH77 hücreleri gibi miyelom tümör hücre çizgilerini içeren çeşitli tümör hücrelerini etkisizleştirebilmektedir. Hastalıklı hücrelerin etkisizleşmesi, EGTA'ya duyarlı bir mekanizma aracılığıyla olabilmektedir. Etkileyici hücrenin (Th1/öldürücü hücreleri), hedef hücreye (hastalıklı hücre) oranı değişebilmektedir. Etkileyicinin hedef hücre oranı en az 1:9, tercihen en az 1:5 ve daha fazla tercihen en az 1:1 olabilmektedir.

Mevcut buluşun bileşimleri, hastalıklı hücreleri yok etmek için kullanılabilmektedir. Hastalıklı

hücreler, bir hastada olabilmektedir. Hasta, örneğin, kanserli olabilmektedir veya bir virüs ile enfeksiyondan dolayı enfekte olmuş doku içerebilmektedir. Hasta, solid bir tümör veya hematolojik habis tümöre sahip olabilmektedir. Bu kullanımda, burada açılanan Th1/öldürücü hücrelerini içeren hastaya uygulanan bir bileşimi içermektedir. Th1/öldürücü hücreleri, tercihen hastaya allojeneiktir. Allojeneik hücreler, normal bir allojeneik donörden olabilmektedir. Alternatif olarak, allojeneik hücreler, çoklu donörlerden türetilmektedir ve bir töropatik bileşime birleşebilmektedir. Tercihen, hasta ve allojeneik hücreler arasındaki doku uyusurluğu uyumsuzluğu maksimum olmaktadır. Hasta ve allojeneik hücreler arasında biraz doku uyusurluğu, tolere edilebilmektedir ve istenen etkiyle sonuçlanabilmektedir.

10

Th1/öldürücü hücreler, intradermal olarak, intravenöz, intraperitoneal olarak ve benzerleri gibi çeşitli yollarla hastaya uygulanabilmektedir. Hastaya, bir doz veya çoklu dozlar uygulanabilmektedir. Hastaya uygulanan birden fazla hücre değişebilmektedir ve özel hastalığa hasta, etkinleşme yöntemi ve diğer faktörlere bağlı olabilmektedir. Genel olarak, hasta etkinleşen Th1 hücrelerinin en az 10^7 'si, tercihen en az 10^8 ve daha fazla tercihen en az yaklaşık 10^9 hücre uygulanmaktadır.

15

Mevcut buluşun bileşimi, Th1/öldürücü hücreleri içeren bir bileşime uygulanarak bir hastayı tedavi etmede kullanılabilmektedir. Hasta, Th1/öldürücü hücrelerinin bir veya daha fazla dozunu alabilmektedir. Dozların miktarı ve frekansı değişebilmektedir ve özel hastalığa bağlıdır. Tercih edilen yapılandırmalarda, Th1/öldürücü hücreleri, hastaya allojeneiktir ve hastaya Th1/öldürücü hücrelerin uygulanması nakledilen dokuya karşı konak hastalığı olmadan bir konağa karşı nakledilen doku etkisi ile birlikte bir konağa karşı tümör etkisine neden olmaktadır.

25

ÖRNEKLER

Malzemeler: PE-eşlenik CD40L, Beckman Coulter, Brea, CA'dan satın alınmıştır. 7-Amino-Aktinomisın D (7-AAD) (1000x), Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI'den satın alınmıştır. Plazmalit A, Baxter Scientific, Deerfield, IL'den satın alınmıştır. İnsan serum albumini (HSA), McKesson, San Francisco, California'dan satın alınmıştır. FcR Bağlayıcı İnhibitör eBioscience, San Diego, CA'dan satın alınmıştır. Dynabeads ClinExVivo™, Invitrogen, Carlsbad, CA'dan satın alınmıştır.

30

Kültürde Etkinleşen Hücrelerin Hazırlanması (CAC)- CD4+ T-hücreleri, Invitrogen'den

35

(yeri) elde edilen CD3/CD28 ClinEx Vivo Dynal Beads varlığında 9 gün kültürlenmiştir. Hücreler, 37°C'de ve %5 CO₂ ortamında Life Cell Şişelerinde (Baxter) çoğaltılmıştır ve kültürün 3 ve 6. gününde boncuklar ile yeniden uyarılmıştır. Kültürde 9 günden sonra, boncuklar çıkartılabilmektedir ve hücreler CAC olarak ifade edilebilmektedir.

5

Formülasyon Tamponunda Hücrelerin Hazırlanması (CFB)-CAC, yetiştirme için cRPMI ortamına yerleştirilmiştir. Zaman, formülasyon protokolünün başlangıcını belirtmek için kaydedilmiştir. cRPMI ortamındaki hücreler, sentrifüjlenmiştir, süzüntü çıkartılmıştır ve hücreler cRPMI tamponunda yeniden askıya alınmıştır. Hücre canlılığı, Tripan Mavisi analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Canlı hücrelerin toplam hücre sayısı ve konsantrasyonu, yaşayabilir hücrelerin yüzdesini belirlemek için kullanılmıştır. Numune yüzde 80'den daha fazla hücre canlılığına sahip olduysa, ondan sonra prosedür yeniden etkinleşme ve hücrelerin formülasyonu için devam etmiştir.

10

15 CAC hücreleri 1×10^7 hücre/ml konsantrasyonunda yeniden askıya alınmıştır. Yeniden etkinleşme, 1×10^7 hücre/ml canlı hücre konsantrasyonunda yapılmıştır. Yeniden etkinleşme, hacme bağlı olarak bir 24 kuyu plakada, 6 kuyu plakada veya 75 cm³ kapta yapılmıştır. Dynabeads ClinExVivo™ CD3/CD28, hücreleri yeniden etkinleştirmek için eklenmiştir ve 4 saat %5 CO₂ ve 36-38°C'de inkübe edilmiştir.

20

4 saat inkübe edildikten sonra, hücreler çıkartılmış ve son formülasyon tamponu (FFB) ile 50 ml. tüpe transfer edilmiştir. FFB, %1 HSA ile PlasmaLyte A'dır. Yeniden etkinleştirilmiş hücreler sentrifüjlenmiştir, süzüntü alınmıştır ve FFB'de yeniden askıya alınmıştır. Bunlar, formülasyon tamponundaki (CFB) hücreler olarak ifade edilmektedir.

25

CFB, her ml için 10^7 hücre konsantrasyonunda FFB'de yeniden askıya alınmıştır. CFB; ID, IT veya IV uygulama için yeniden askıya alınmıştır. 1ml hücre süspansiyonu, bir ID formülasyonu olarak bir 3ml şırıngaya eklenmiştir. IT ve IV formülasyonlar 3 ml ve 5 ml idi. Uygun formülasyonlu şırıngalar, yaklaşık 4°C ortalama sıcaklık ile buzdolabında saklanmıştır.

30

Depolama sonrası numunelerin toplanması Hücreler ve süzüntü farklı zaman noktalarında toplanmıştır. Zaman noktaları aşağıdaki gibidir: 0 (ilk); Oda Sıcaklığında (RT) 2 saat; 4°C'de 48 saat; 48 saat 4°C'de olduktan sonra 2 saat RT'de.

35

Her zaman noktasında, 100ul hücre süspansiyonları toplanmış ve hücreler 400g'de 5 dakika 4°C'de döndürülmüştür. Süzüntü daha sonra ELISA kullanılarak IFN- γ saptama için diğer tüpe transfer edilmiştir. Hücreler, akış sitometrisi için 150ul boyama tamponunda yeniden askıya alınmıştır. Bazı deneylerde, hücreler, 100ul cRPMI ortamında yeniden askıya alınmış ve 24 saat %5 CO₂ ile 37°C'de inkübatörde kültürlenmiştir. Süzüntü, 24 saatlik inkübasyondan sonra alınmış ve IFN- γ , ELISA ile tayin edilmiştir.

Akış sitometrisi (CD40L ve 7-AAD)- 50ul hücre süspansiyonu, sırasla boyanmamış CD40L ve 7-AAD olarak etiketlenen 3 ependorf tüpü içine yukarıdan aşağı (150 ul) transfer edilmiştir. Boyanmamış tüp 20 dakika buzda inkübe edilmiştir. CD40L tüpü için, buzda 20 dakika için üreticinin yönergelerine göre, hücreler FcR bağlayıcı inhibitör ile önceden inkübe edilmiştir. Daha sonra 40ul boyama tamponu (PBS+%1FBS) ve 10ul PE-CD40L antikoru, hücre süspansiyonuna eklenmiştir ve karanlıkta buz üzerinde 20 dakika daha inkübe edilmiştir.

Hücre canlılığı 7-AAD akış sitometrisi ile test edilmiştir. 7-AAD, ölü DNA'ya veya hasarlı hücrelere eklenmektedir, böylece, 7-AAD pozitif hücrelerinin belirlenmesi hücre canlılığına bir göstergesidir. 7-AAD tüpleri için, tüpler 6°C'de 5 dakika 400g'da sentrifüjlenmiştir. Süzüntü atıldıktan sonra, hücre peletleri 100ul 1x 7-AAD çözeltisinde yeniden askıya alınmıştır. Tüp, karanlıkta 15 dakika inkübe edilmiştir. 1 ml boyama tamponu, CD40L tüpüne eklenmiştir ve sonra 3 tüp birlikte sentrifüj edilmiştir. Süzüntü atıldıktan sonra, hücre peletleri 0.4ml boyama tamponunda yeniden askıya alınmış ve FACS çalışılmıştır.

Örnek 1-CD4+ hücrelerinin saflaştırılması ve hücre fenotipleşmesi Normal donör periferel kan elde edilmiştir ve beyaz kan hücrelerinin bir tabakasından CD4+ hücreleri, Miltenyi Biotec (Auburn, CA)'ten elde edilen Miltenyi manyetik boncuklar ve kolon kullanılarak saflaştırılmıştır. Şekil 1, yana saçılma (hücrelerin boyut ve yoğunluğunu ölçmektedir) karşı CD4'ün bir akış sitometrisi çizimidir. Şekil 1, CD4+ hücrelerinin toplam popülasyonunun (N=22) yaklaşık %46'sı olduğunu göstermektedir. CD4+ hücreleri için pozitif seçimden sonra, sonuç %98.69 saf CD4+ hücreleridir (N=22). Şekil 1B'den görülebildiği gibi, kolondan sonra CD4+'nın popülasyonu, hem lenfosit hem de monositleri içermektedir.

Her seri, farklı bir donörden üretildiği için, antijen işaretleyicileri üretimin sonunda ve başında test edilmiştir. CD4+ hücrelerinin hücre fenotipleşmesine (Şekil 2A) karşı kültürde etkinleşmiş hücreler (CAC) (Şekil 2B) test edilmiştir. Sonuçlar, bir naif CD4+ fenotipten (CD45RA+) bir

bellek fenotipine (CD45RO+) uyumlu bir kaymay göstermektedir. Şekil 2A, sırasıyla CD45RA, CD45RO ve CD25 için CD4+ hücrelerinin fenotiplerini göstermektedir. Şekil 2B, sırasıyla CD45RA, CD45RO ve CD25'in yüzde ifadesi için analiz ve 9 günlük kültürden sonra CAC'nin fenotiplerini göstermektedir. Karşılaştırmalı bir CD45RA/CD45RO popülasyonundan, bir CD45RA negatif CD45RO pozitif popülasyon elde edilmektedir. CD25+ hücreleri, genişleme sürecinin başında yaklaşık olarak %10'dur. Gün 9'da, CD25+ yaklaşık olarak %85 idi. Bu, hücrelerin etkinleşme durumu ile uyumludur. Şekil 2A, kolon CD45RA + hücrelerinin (ort=%44.76 n=29), CD45RO+ (ort=%53.44 n=29) ve CD25+ (ort=%10.83 n=29) naif bir fenotipini gösterdikten sonra CD4+ hücrelerini göstermektedir. Şekil 2B, devamlı uyartımla ile kültürde 9 günden sonra, fenotipin hücre benzeri Th belleğe dönüştüğünü göstermektedir. CD45RA, sert şekilde azalmaktadır (ort= %4.22 n=29), CD45RO+ ortalama 97.8'e yükselmektedir (n=29), CD25+ ortalama %90.03'e (n=29) yükselmektedir.

CD62L İfade modeli -Şekil 3, Gün 0'da, CD4+ tohum hücrelerinin yaklaşık olarak 10^3 (aritmetik ortalama 541 n=17)'te maksimum pik ile çift modlu bir CD62L ortalama flüoresan yoğunluğu (MFI) ifade ettiğini göstermektedir. MFI, kültürde 9 günden sonra aritmetik bir 1541 (CAC) ortalamasına artmaktadır ve sonra son 4 saatlik etkinleşme sonrası (CFB), önemli derecede düşmeye başlamaktadır (aritmetik ortalama 190.3).

CD40L İfade Modeli--CAC üzerindeki CD40L ifadesinin yoğunluğu, CD3/CD28 boncukları ile 4 saat etkinleşmeden sonra CAC yüzeyinde sürekli olarak artmaktadır. Şekil 4, etkinleşme öncesi (Şekil 4B) ve 4 saatlik etkinleşme CFB sonrası (Şekil 4C) gün 0'da (Şekil 4A) CD4+ ve gün 9'da toplanan CAC'yi karşılaştırarak temsili bir serinin CD40L ifade yüzdesi ve aritmetik ortalamasındaki değişimi göstermektedir. Görülebileceği gibi, etkinleşmemiş ve etkinleşmiş hücreler arasındaki fark, CD40L+ hücrelerinin yüzdesinde fazla değildir, ancak tersine CFB için ortalama 112 olurken (n=29) aritmetik ortalama CAC için ortalama AM 20'dir (n=29) fazladır.

Son etkinleşme boyunca sitokin salgılayan her üretim serisinden 9 günde toplanan CAC hücrelerinin numuneleri, 4 saat CD3/CD28 boncukları ile etkinleşmiştir ve süzüntüler toplanmıştır ve ELISA analizi kullanılarak sitokin üretimi ($IFN\gamma$, IL-4, IL-8, $TNF\alpha$ ve GM-CSF) için test edilmiştir. Tablo 1, bu deneylerin sonuçları göstermektedir.

Tablo 1

Seri Kodu	IFN γ	IL4	GM-CSF	TNF α
068C	2,178.3	0.00	647.9	1,338.3
069C	2,500.0	0.00	809.9	1,245.8
070C	5,469.1	0.00	1,595.9	1,994.9
071C	6,995.4	0.00	1,739.3	2,799.0
072C	806.6	0.00	251.1	117.7
073C	2,931.5	0.00	596.6	358.3
074C	462.9	0.00	0.0	105.3
075C	2,722.5	0.00	927.0	1,189.7
076C	4,118.0	0.30	752.0	576.7
078C	1,072.0	0.00	294.2	393.1
080C	3,846.7	0.90	1,878.4	1,828.4
081C	9,702.8	0.35	9,030.4	1,522.9
082C	6,662.4	0.76	3,984.9	869.0
083C	910.8	0.00	344.4	365.5
087C	2,257.6	0.00	764.6	736.8
088C	4,342.1	0.00	2,539.4	3,961.5
090C	1,021.4	1.00	402.0	810.5
094C	1,420.2	1.03	733.6	757.2
097C	703.2	1.16	327.7	989.4
Ortalama (n=15)	3,816.0	0.29	1,779.7	1,358.8

Sadece IFN γ ve IL-4 değerleri, fonksiyonel salınım için kullanılmıştır. 19 ardışık seri için testler, Tablo 1’de gösterilmektedir (değerler pg/10⁶ hücre/4 saat olarak ifade edilmektedir). Rapor edilen ortalama, sadece serileri geçenleri içermektedir.

rnek 2-Th1/ldrc hücreleri ile etkinleşen Doğrudan ldrme. CFB’nin tümör hücreleri üzerinde doğrudan etkisi olup olmadığını test etmek için, hücrelerin ARH77 hücre çizgisini öldürme yeteneği test edilmiştir. Bu hücre çizgisi, kurulan bir miyelom hücre çizgisidir. ARH77 hücreleri, CFB’den onlarca farklılaştırmak için CFSE’de boyanmıştır. CFB, 18 saat farklı etkileyicide (CFB) Hedef’e (ARH77) boyanmıştır. ARH77 hücreleri ile karştırılmıştır. Bu zamandan sonra, 7AAD eklenmiştir ve hücreler FC500MPL akış sitometresi kullanılarak elde edilmiştir. Bu deney, temiz ve erimiş CFB ve farklı CAC serileri ile tekrar edilmiştir. DynaBeads ile sadece ARH77, CAC ile CD4+ hücreleri, gösterilmeyen önemli ölüm (%10’dan daha az) verisine sahip değildi. şekil 5’te gösterilen sonuçlar, CAC hariç CFB, CD4+ hücreleri veya boncuklar ARH77 hücre çizgisinde doğrudan öldürücü etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Doğrudan ldrc etkinin doğası Perforin-Granzim yolağından ötürü etkinin görülüp

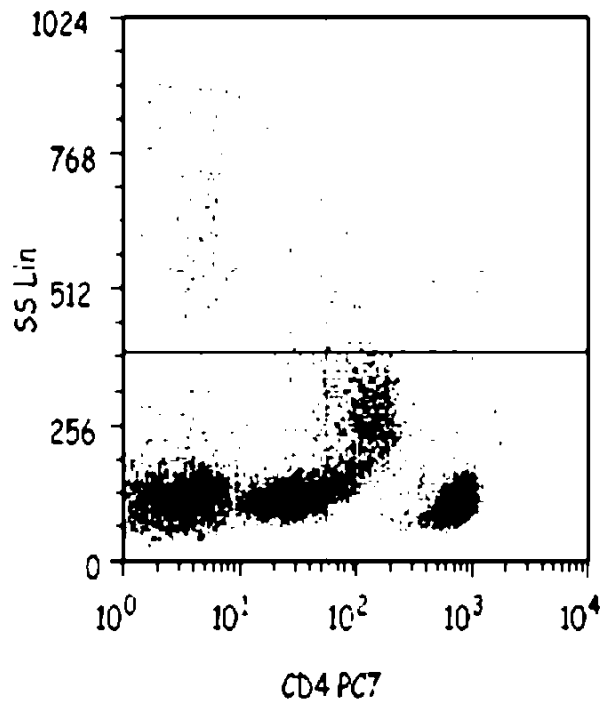
görülemeyeceği bakımdan incelenmiştir. Hem iç boyama hem western blot teknikleri, Perforin ve Granzim B için boyama amaçlı kullanılmıştır. Şekil 6A, görülebileceği gibi, CAC'nin çok düşük Granzim B ifade ettiğini göstermektedir. Şekil 6B, CFB'nin önemli miktarda Granzim B ifade ettiğini göstermektedir. Şekil 6C, sadece western blot kullanılarak tayin edilebilmektedir. Yol 1, bir pozitif kontrol olarak etkinleşen PBMcler'in özütüdür. Yol 2&4, farklı serilerin CAC'leridir ve yol 3&5, aynı serinin CFB'leridir.

İnhibisyon analizleri, doğrudan öldürme mekanizmasını doğrudan açığa kavuşturmak için gerçekleştirilmiştir. CFB, yukarıda açıklandığı gibi ARH77 ile karşılaştırılır ve aşağıdaki Tablo 2'de gösterildiği gibi, farklı engelleyici maddeler eklenmiştir. CD40L ve/veya FAS-L'ye karşı antikolar, CFB:ARH77 karşılaştırılabilir eklenmiştir. Tablo 2, en yüksek konsantrasyonun öldürücü profilini engellediğini göstermektedir.

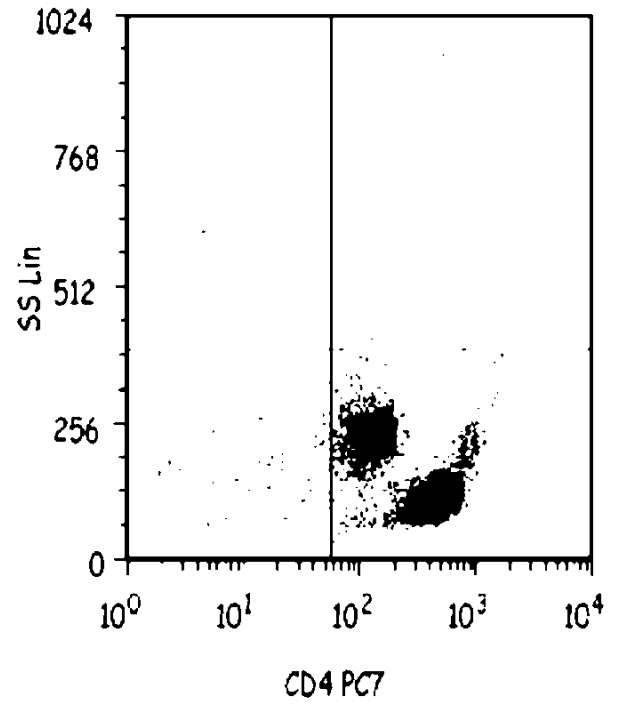
Tablo 2

	Anti C40L	İnhibisyon yok	0.1µg/ml	1µg/ml	20µg/ml
Anti Fas-L			35.48	35.92	35.5
inhibisyon yok		33.85			
1ng/ml	36.55		34.55		
10ng/ml	38.86				
200ng/ml	38.97				30.0

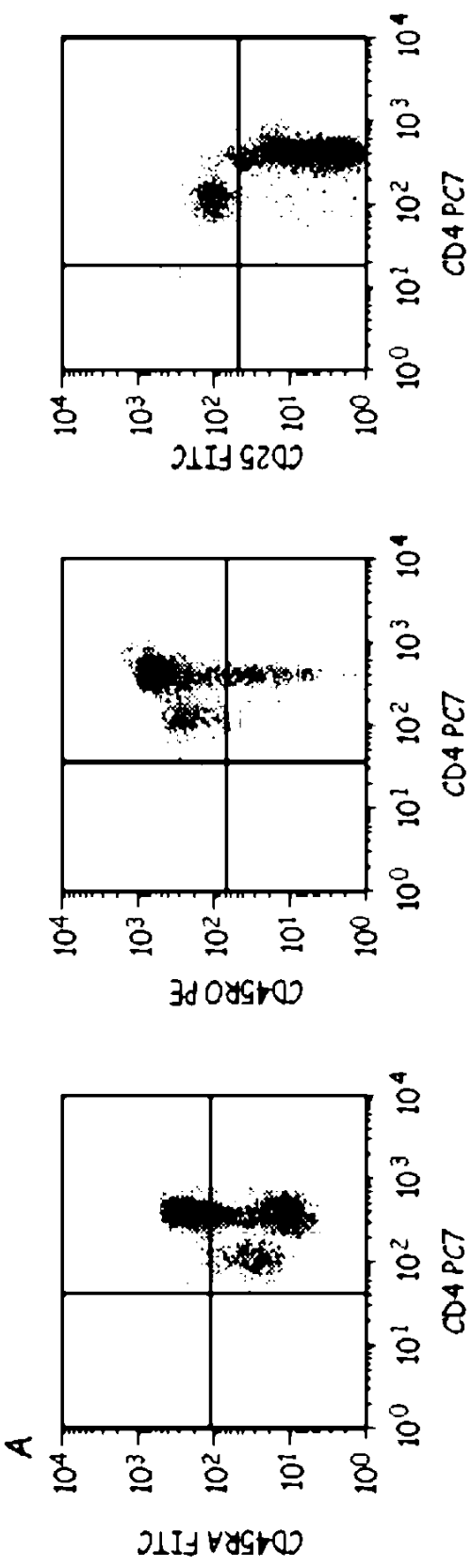
EGTA'nın doğrudan öldürme üzerindeki etkisi incelenmiştir. EGTA, Perforin'in polimerizasyonunu önlemektedir ve Perforin/Granzim B mekanizmasını inhibitörü olarak görev yapmaktadır. 1 mM EGTA, yukarıda açıklanan doğrudan öldürme analizine eklenmiştir. Şekil 7'de gösterildiği gibi, 1mM EGTA, ortalama %50 (n=7) Bağlı testi P değeri 0.0002 tarafından öldürmeyi azaltmıştır. CFB'nin gösterdiği doğrudan öldürme etkisi, Perforin-Granzim yolağından gelmektedir.



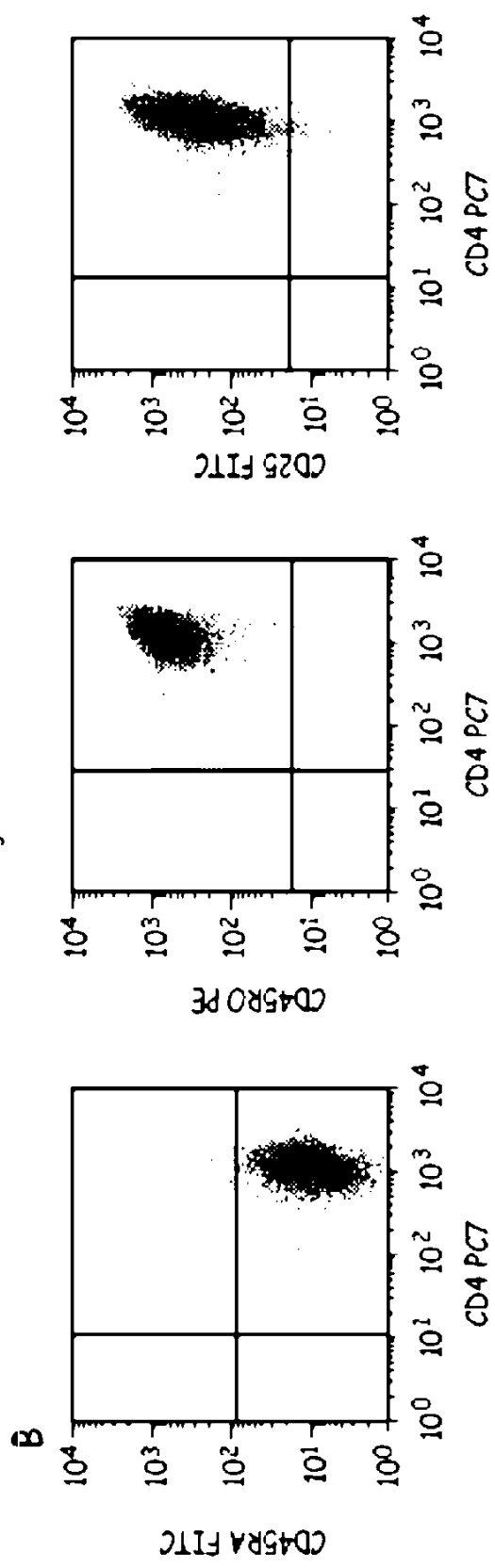
ŞEKIL 1A



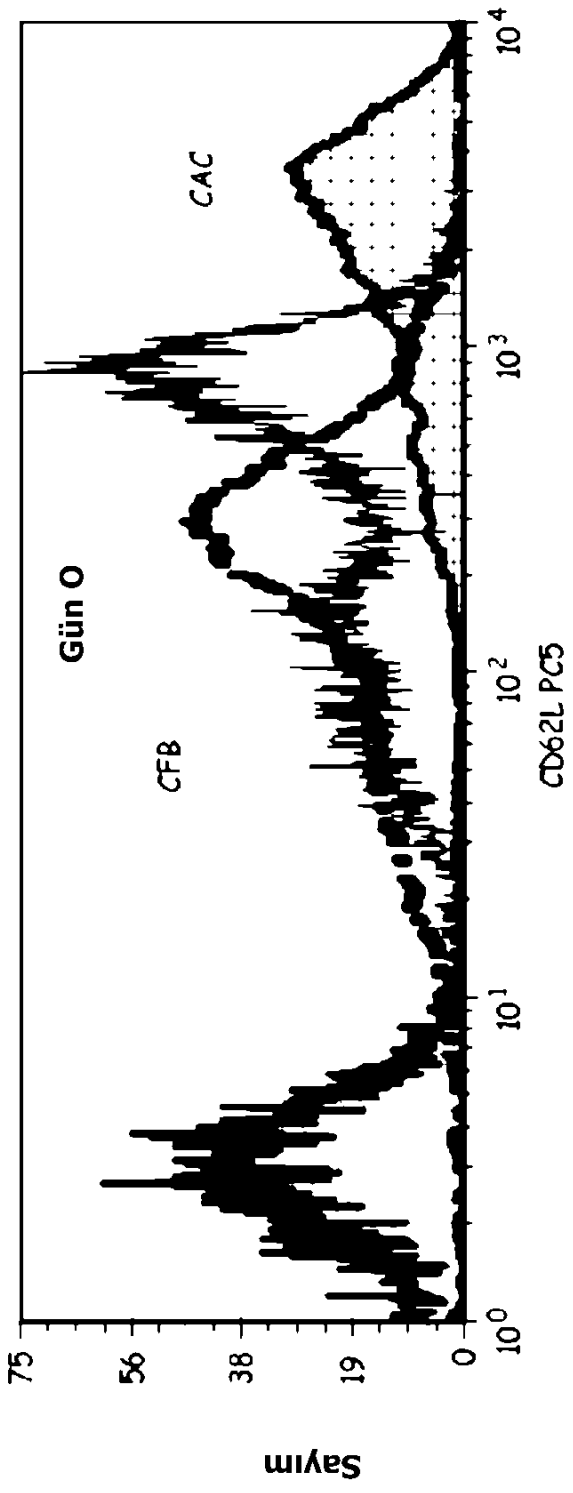
ŞEKIL IB



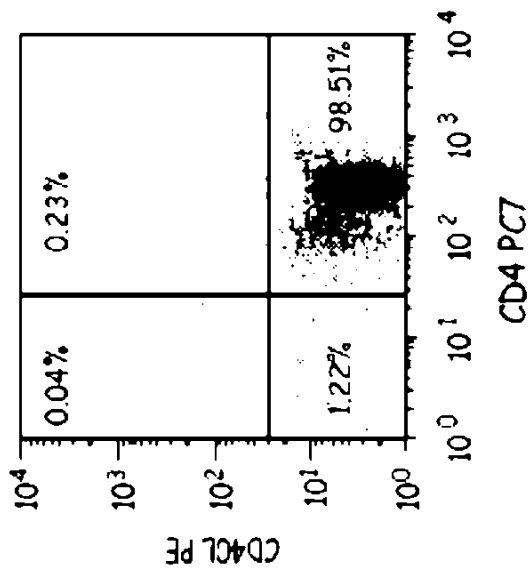
ŞEKİL 2A



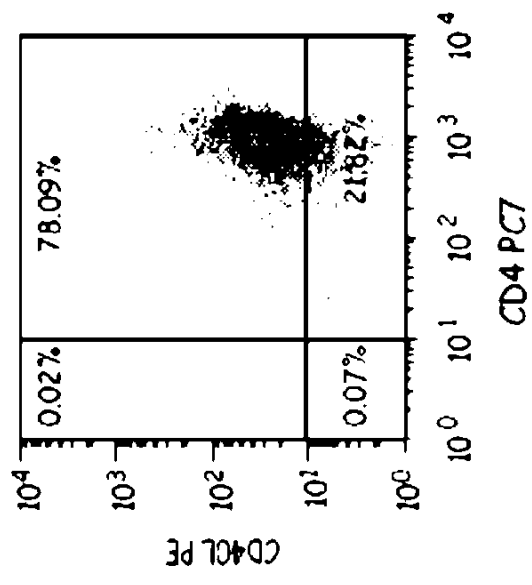
ŞEKİL 2B



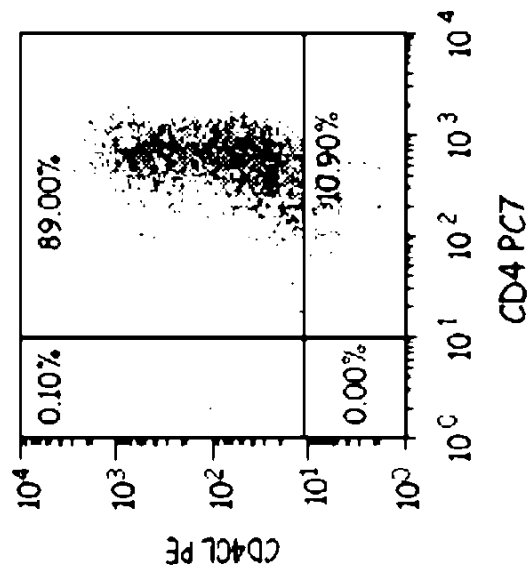
ŞEKİL 3



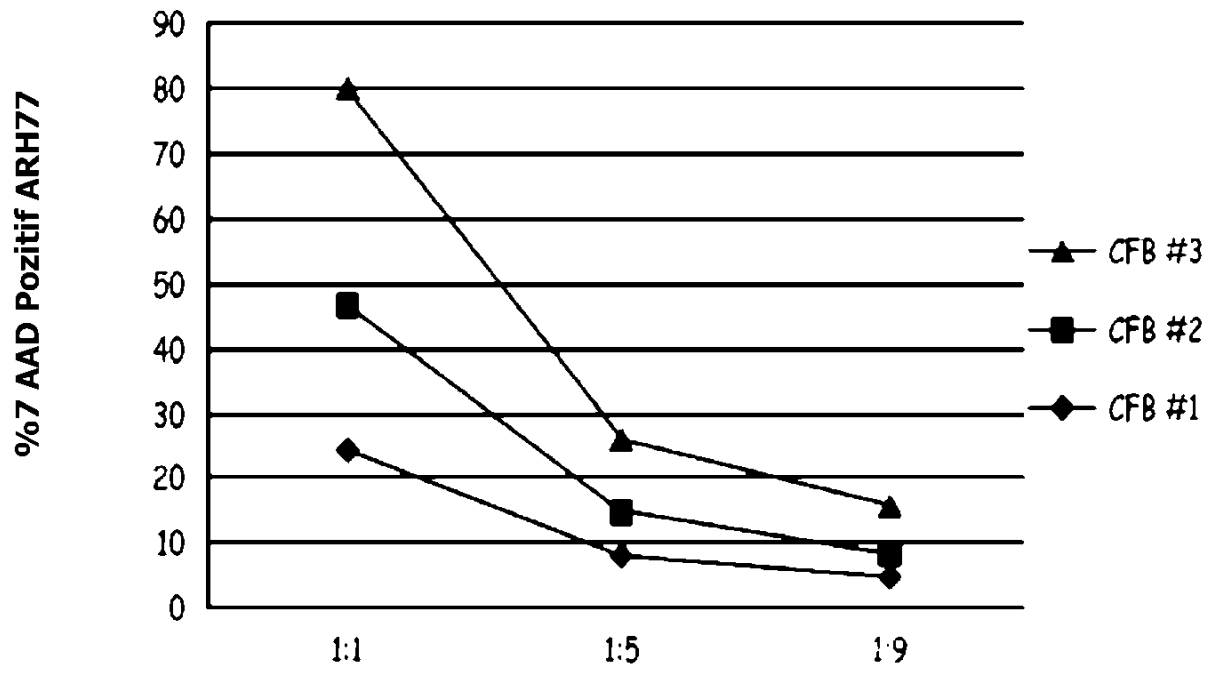
ŞEKİL 4A



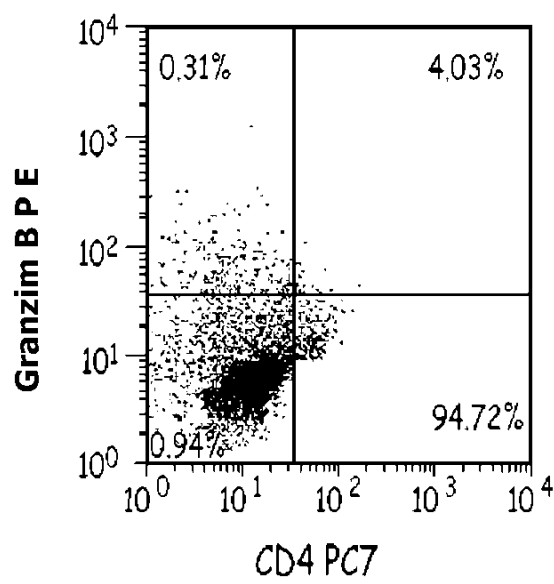
ŞEKİL 4B



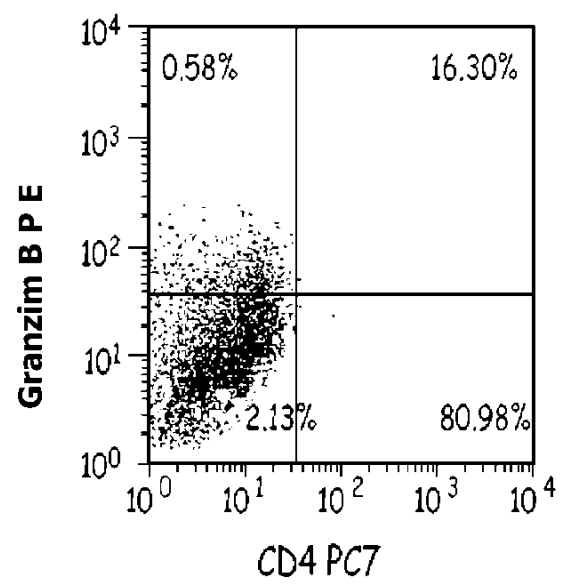
ŞEKİL 4C



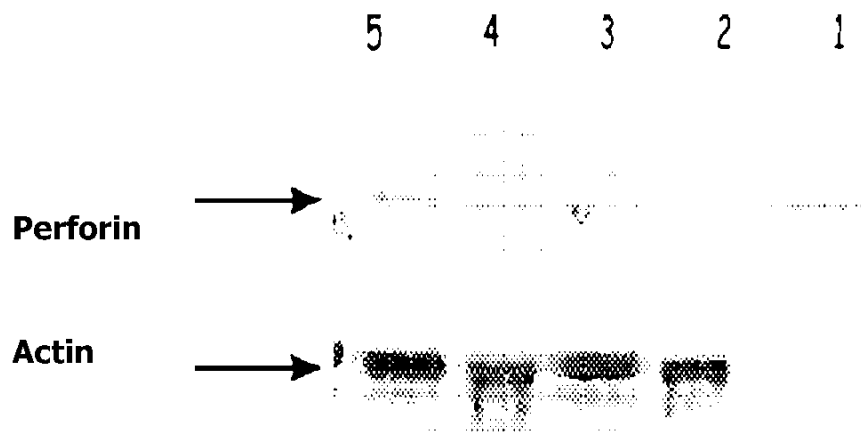
ŞEKİL 5



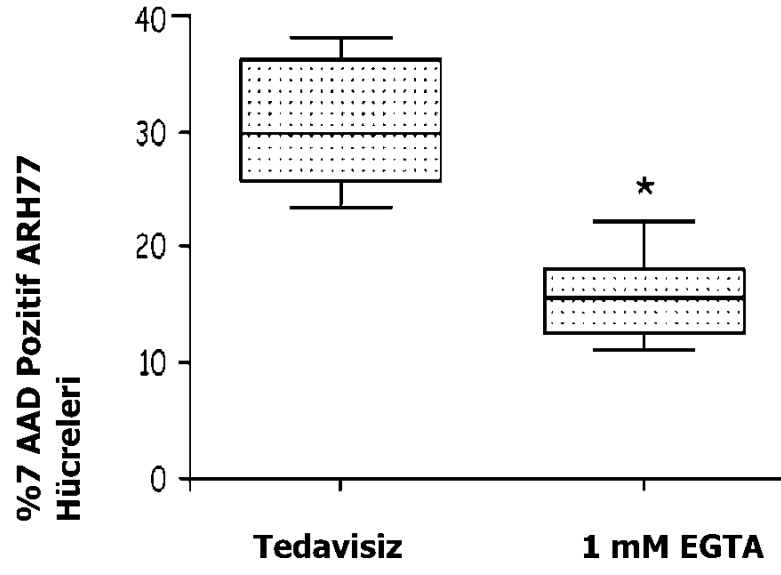
ŞEKIL 6A



ŞEKIL 6B



ŞEKIL 6C



ŞEKİL 7