



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **123821** (13) **C2**
(51) МПК (2021.01)**A61K 38/20** (2006.01)**A61K 35/14** (2015.01)**A61K 35/17** (2015.01)**C12N 5/078** (2010.01)**G01N 33/53** (2006.01)

A61P 35/00

A61P 37/00

A61P 29/00

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2017 00274**
(22) Дата подання заявки: **11.06.2015**
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **10.06.2021**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **10 2014 211 167.6**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **11.06.2014**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заяву: **DE**
(41) Публікація відомостей про заяву: **10.03.2017, Бюл.№ 5**
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: **09.06.2021, Бюл.№ 23**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **РСТ/EP2015/063108, 11.06.2015**

(72) Винахідник(и):
Маеурер Маркус (SE)
(73) Володілець (володільці):
ПОЛІБІОСЕПТ ГМБХ,
Siemensstrasse 24, 63755 Alzenau (DE)
(74) Представник:
Кістерський Кирило Арсенійович,
реєстр. №207
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
WO 2008066609 A1, 05.06.2008
WO 2007071390 A1, 28.06.2007
WO 2007071409 A1, 28.06.2007
Huartea Eduardo et al. Ex vivo expansion of tumor specific lymphocytes with IL-15 and IL-21 for adoptive immunotherapy in melanoma. Cancer lettery - 2009y - Vol. 285. - No.1. - P. 80-88
Santegoets Saskia JAM et al. IL-21 promotes the expansion of CD27+ CD28+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells. Journal of translational of medicine. - 2013. - Vol. 11. - No. 1. - P. 37

(54) КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЕКСПАНСІЇ ЛІМФОЦИТІВ IN VITRO**(57) Реферат:**

Винахід стосується композиції для експансії лімфоцитів in vitro, яка містить інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 15 (IL-15) та інтерлейкін 21 (IL-21), де композиція знаходиться в рідкій формі, концентрація IL-2 в рідкій композиції знаходиться в діапазоні від 500 до 2000 МО/мл, концентрація IL-15 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл, і де концентрація IL-21 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл. Винахід також належить до способу одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів та популяції лімфоцитів, одержаної таким способом.

UA 123821 C2

ГАЛУЗЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід стосується активної клітинної імунотерапії, включаючи спосіб одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів з використанням композиції попередньо визначених цитокінів. Винахід додатково стосується композиції цитокінів та згенерованих клінічно релевантних лімфоцитів.

ВІДОМИЙ РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Рак залишається однією з найбільш поширених причин смерті в розвинутих країнах. Приклад, в США та Німеччині він є другою за поширеністю причиною смерті зі смертністю 560000 (2009) та 218000 (2010), відповідно. Коефіцієнти виживаності залишаються низькими для багатьох раків незважаючи на поліпшення здатності детектувати та лікувати цю групу хвороб.

З онкологічних хвороб, рак підшлункової залози є четвертою за значенням причиною смерті від раку в США та Швеції без ознак поліпшення. К моменту постановки діагнозу раку підшлункової залози більшість пацієнтів є невиліковними, причому локально поширений рак або метастазуюча пухлина дозволяють проводити лише паліативне лікування. Середня виживаність становить приблизно шість місяців. Лише у приблизно 15-20 % пацієнтів мають операбельну пухлину і, отже, потенційно вилікову хворобу. Як і більшість раків, рак підшлункової залози є системною хворобою, яка потребує раннього та системного втручання. У порівнянні з багатьма іншими типами раку, рак підшлункової залози є високорезистентним до хіміотерапії та резистентним до опромінювання. Для досягнення значних досягнень в поліпшенні несприятливого прогнозу при раку підшлункової залози необхідно знайти нові альтернативи та більш ефективні концепції лікування. Біологія раку підшлункової залози пов'язана з як місцевою, так і з системною імуносупресією, яка дозволяє пухлині прогресувати та метастазувати.

Схожа ситуація існує з гліобластомою, яка є найбільш поширеною та прогресуючою гліомою з частотою випадків 2-3/100000 в США. Гліобластома складає до 12-15 % випадків усіх внутрішньочерепних та 50-60 % гістіоцитарних пухлин. Нові схеми лікування підвищили середню загальну виживаність (14,6 місяців при променевої терапії плюс темозоломід у порівнянні з 12,1 місяців при одній лише променевої терапії). Досі спроби розробити надійні та клінічно ефективні імунотерапевтичні протоколи були невтішними для пацієнтів з гліобластомою або пацієнтів з раком підшлункової залози. Один з підходів до лікування таких раків полягає в подоланні індукованого пухлиною пригнічення та/або в індукуванні націлених на пухлину клітин та гуморальних імунних відповідей.

Одним з найбільш перспективних досягнень є новий терапевтичний клас, називаний активною клітинною імунотерапією (ACI). Ракові імунотерапії можуть бути або пасивними, або активними. Пасивна терапія ґрунтується на адоптивному перенесенні імунomodulatorів, включаючи цитокіни, пухлиноспецифічні антитіла або імунні клітини. Ці речовини або клітини потім вводять пацієнту для ініціювання протипухлинної дії. Загалом, ці терапії не створюють імунологічної пам'яті і тому потребують лікування на основі хронічної інфузії. Активні імунотерапії, з іншого боку, стимулюють імунну систему пацієнта з метою промотування антигенспецифічного протипухлинного ефекту з використанням власних імунних клітин організму. На додаток, активні імунотерапії намагаються створити довготривалу протипухлинну відповідь, яка може захищати від мінімальної залишкової хвороби та рецидивів пухлини.

Клінічно релевантна та довготермінова ремісія з використанням Т-клітин, спрямованих проти пухлин (пухлина-реактивні Т-клітини) була досягнута у пацієнтів з меланою (2, 3). У принципово важливій статті нещодавно було показано, що найкраща та довготривала відповідь при лікуванні раку досягається, коли власні Т-клітини пацієнта будуть спрямовані проти власних пухлинних клітин пацієнта, тобто, власних "індивідуальних" мутацій пацієнта (4). Такі багатонадійні результати були також отримані для пацієнтів з епітеліальними пухлинами, тобто, шляхом адаптивного перенесення Т-клітин, націлених на мутантні епітопи, при епітеліальному раку (5). Ці підходи звичайно ґрунтуються на збиранні лімфоцитів, що проникають в пухлину (TIL), з пухлинних уражень, або Т-клітин з периферичної крові.

Недавній звіт Підкомітету з адаптивної клітинної терапії Програми оцінки протиракової терапії (CTEP Subcommittee on Adaptive Cell Therapy) підсумував протоколи експансії пухлинореактивних Т-клітин з периферичної крові та TIL.

Ці дослідження склали дорожню карту для використання терапії TIL або терапії на основі Т-клітин з конкретним фокусом на стабільності продукту та ефективному виході Т-клітинних продуктів. Як стабільність, так і вихід націлених на меланому Т-клітин, очевидно, є досяжними при використанні сучасних методик, які дозволяють ввести стратегії на основі Т-клітин в основний напрямок лікування раку, разом з біологічними засобами, тобто, терапіями, націленими проти CD40L або PD-1.

Мінімально культивовані TIL, очевидно, забезпечують найбільш ефективний фенотип та профіль для клінічного застосування (11). Найбільш успішний на сьогодні підхід полягає у використанні аутологічних *ex vivo* активованих Т-клітин, вирощуваних у 24-лункових планшетів, тестуванні на імунні ефекторні функції та, додатково, експансії з використанням IL-2, алогенних живильних клітин та ОКТ3 (9, 12, 13).

Т-клітини, націлені на CD4⁺ або CD8⁺ пухлинний антиген (TAA), були одержані в умовах GMP (сумлінна виробнича практика) з периферичної крові та використані для складання композицій для подальшого лікування пацієнтів. Це робили з аутологічними CD4⁺ Т-клітинами (14-16) або CD8⁺ Т-клітинами (17), деякі з яких були націлені на антиген NY-ESO-1 (18), який є також можливим в моноклеарних клітинах периферичної крові (МНКПК) здорових пацієнтів без раку, оскільки достатня кількість прекурсорів Т-клітин присутня в периферичній циркуляції. Були описані різні методи експансії Т-клітин для генерування CD8⁺ клонів Т-клітин для спрямованої таргетної терапії (19). Це становить великий інтерес, оскільки було показано, що клональна репопуляція імунної системи пацієнта протипухлинними лімфоцитами індукує регресію раку, але також і аутоімунітет (20).

Рецептура композиції живильного середовища також може бути важливою для успішної активної імунотерапії. Дослідження показали, що голодування впливає на медіовані Т-клітинами імунні відповіді та може індукувати голодування-індуковану імуносупресію, але також і експансію певних підгруп Т-клітин. Цей механізм, напевно, медіюється лептином (21), який також модулює розвиток В-клітин та подальші В-клітинні відповіді (22). Це привело до відкриття шляхів сенсора живильних речовин (тобто, GCN2 у дендритних клітинах), які підсилюють презентацію антигена (23). Недавні дослідження показали, що спричинювана цитокінами експансія Т-клітин (таких як при *ex vivo* експансії TIL або АСТ) є залежною від екзогенних амінокислот, і що цитокіни, тобто, IL-7, здійснюють підвищувальну регуляцію генів, асоційованих з експресією транспортера амінокислоти. Адаптація вимог до живильного середовища буде тому визначатися відповідним використанням цитокіним коктейлем для експансії Т-клітин (24), а також амінокислотами у середовищі; обидва фактори будуть впливати на дозрівання Т-клітин та диференціацію, що є клінічно значущим.

Клінічна (протипухлинна) ефективність, напевно, є медіованою CD8⁺ та центральною пам'яттю клітини, визначуваною CD45RA-CCR7⁺, як було визначено *ex vivo* для пацієнтів, що відкликаються на трапію на основі Т-клітин. Фенотип таких Т-клітин визначається популяцією підданих експансії *ex vivo* Т-клітин, а також факторами, пов'язаними з хазяїном, після адоптивного перенесення. Різноманітна популяція Т-клітин, націлених на ракові клітини, може бути кращою для забезпечення ефективної імунної відповіді, включаючи Т-клітини довготермінової пам'яті, а також Т-клітини, що можуть негайно реагувати на (ракові) клітини-мішені та продукувати протипухлинні імунні відповіді, включаючи термінально диференційовані Т-клітини, що експресують цитолітичні молекули, такі як гранзим та перфорин (25, 26). Довготермінова імунна пам'ять частково визначається підвищеними потенціалом проліферації та періодом напівжиття, які можуть бути виміряні за довжиною теломерів (27, 28).

Відносно небагато відомо про те, які стадії (меланома)-специфічних TIL або клонів Т-клітина є кращими для *in vivo* перенесення, внаслідок розбіжностей генної експресії *in vitro* та *in vivo*, а також відмінностей цитокінного середовища у індивідуальних пацієнтів. Не лише індивідуальний фенотип, але також і досить різні фенотипи, асоційовані зі швидкою доставкою імунних ефекторних функцій (термінально диференційованих CD45RA+CCR7-) Т-клітин, разом із забезпеченням довготермінової імунологічної пам'яті Т-клітин центральної пам'яті, які будуть поповнювати пул диференційованих Т-клітин, можуть бути гарним вибором для експансії Т-клітин.

Аналогічно релевантною, очевидно, є експресія маркерів активації/виснаження, тобто, LAG-3, PD-1 та або 4-1BB на Т-клітинах, які можуть вказувати на більшу зміну для виснаження та втрати функції Т-клітин, а також збагачення специфічних до пухлинного антигена Т-клітин (які мають тенденцію бути PD1⁺, та/або LAG-3, 4-1BB+ (29)).

Було відомо, що NY-ESO-1 є придатною мішенню для специфічних до пухлинного антигена Т-клітин. NY-ESO-1 є антигеном, що використовується в тестах на рак (36, 37), та експресується у великій кількості пухлин. Наприклад, у Karolinska (Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) 50 гліобластомні ураження були піддані скринінгу на експресію білка NY-ESO-1, і було знайдено, що 35 % гліобластом (GB) 3 та 4 ступенів є позитивними щодо NY-ESO-1. Скринінг уражень раку підшлункової залози показав меншу кількість білок NY-ESO-1+ ракових уражень, в діапазоні нижче 20 %, особливо для метастазуючих уражень. Націлювання на NY-ESO-1 для експансії пухлина-реактивних Т-клітин з периферичної крові, очевидно, є "надійним вибором" мішені, оскільки NY-ESO-1, напевно, експресується лише в злоякісних клітинах та яєчку без

явної неспецифічної реактивності у націлених на NY-ESO-1 Т-клітинах (36). Це є дуже цікавим, оскільки було продемонстровано, що клональна репопуляція імунної системи пацієнтів протипухлинними лімфоцитами індукує регресію раку та аутоіmunітет (20), потенційний ризик. NYESO-1 проходив тестування у ряді досліджень як потенційна мішень при гліобластомі (GB), а також в GB-стовбурових клітинах (38), разом з використанням агентів метилування ДНК для підвищення реактивності NY-ESO-1 (39, 40).

Враховуючи відомий рівень техніки, метою даного винаходу є створення удосконалених способів імунотерапії.

СУТЬ ВІНАХОДУ

Даний винахід оснований, поміж іншого, на відкритті того, що композиція, яка містить цитокіни інтерлейкін-2 (IL-2), інтерлейкін-15 (IL-15) та/або інтерлейкін-21 (IL-21), забезпечує кращу стимуляцію та експансію лімфоцитів, зокрема, клінічно релевантних лімфоцитів. Процедура експансії та стимуляції сумішшю цитокінів є високочутливою та дозволяє одержувати популяцію клінічно релевантних лімфоцитів, навіть якщо вихідна концентрація у зразку є дуже низькою.

Таким чином, згідно з першим аспектом, винахід передбачає композицію для експансії лімфоцитів, яка містить принаймні два типи цитокінів, вибраних з інтерлейкіну 2 (IL-2), інтерлейкіну 15 (IL-15) та інтерлейкіну 21 (IL-21).

З цією композицією цитокінів автори винаходу змогли визначити новий спосіб одержання популяції відрегугованих за допомогою антигенів лімфоцитів. Отже, згідно з другим аспектом, даний винахід передбачає спосіб одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів, який включає стадії:

- одержання зразка з організму ссавця, зокрема, зразка тканини або зразка рідини організму, що містить принаймні один лімфоцит та, необов'язково, виділення клітин у зразку з організму,
- культивування зразка з організму *in vitro* для експансії та/або стимулювання лімфоцитів у зразку, причому культивування включає використання IL2, IL-15 та/або IL-21,
- необов'язково, визначення присутності клінічно релевантного лімфоцита у культивованому зразку.

Спосіб відповідно до другого аспекту винаходу приводить до утворення популяції лімфоцитів, яка включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів.

Згідно з третім аспектом, винахід передбачає клінічно релевантний лімфоцит, одержаний способом згідно з другим аспектом, де клінічно релевантний лімфоцит вибирають з В-клітини, природної клітини-вбивці (NK) та Т-клітини.

Згідно з четвертим аспектом, даний винахід передбачає популяцію лімфоцитів, одержаних відповідно до другого аспекту винаходу, що включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів.

Популяція клінічно релевантних лімфоцитів, одержана способом згідно з другим аспектом винаходу, є, зокрема, кращою для клітинної імунотерапії.

Згідно з п'ятим аспектом, винахід передбачає імунотерапію для лікування або профілактики онкологічної хвороби, інфекційної хвороби або аутоіmunної хвороби у ссавця, який включає стадії генерування популяції клінічно релевантних лімфоцитів згідно з другим аспектом винаходу, у якій зразок з організму одержують від зазначеного ссавця, та введення популяції клінічно релевантних лімфоцитів зазначеному ссавцю.

Згідно з шостим аспектом, винахід передбачає композицію згідно з першим аспектом винаходу, призначену для використання у консервативному лікуванні, зокрема, для лікування та профілактики інфекційної хвороби, аутоіmunної хвороби або онкологічної хвороби.

Отже, згідно із сьомим аспектом, винахід передбачає набір для використання у консервативному лікуванні, зокрема, для лікування або профілактики інфекційної хвороби, аутоіmunної хвороби або онкологічної хвороби, де набір включає IL-2, IL-15 та IL-21, та, необов'язково, принаймні один з компонентів, що стимулюють TCR, зокрема, ОКТ3, коstimулюючі молекули, живильні клітини та пептид, що містить амінокислотну послідовність принаймні клінічно релевантного антигену.

ФІГУРИ

Фіг. 1 зображує три графіки, на яких представлені результати аналізу методом протокової цитометрії зразків, одержаних при експансії МНКПК з цитокіновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 в комбінації із зольєдреновою кислотою. Зразки брали в різні моменти часу, як вказано над графіками. Виміряні сигнали є сигналом CD3 в напрямку осі у, та сигналом TCR гамма-дельта в напрямку осі х. Гамма-дельта Т-клітини обведені прямокутником. Зображення, які в оригіналі були кольоровими, показують інтенсивності перекривних сигналів за шкалою сірих тонів. Процентна частка клітин у прямокутній ділянці вказана зверху.

Фіг. 2 зображує результат аналізу методом протокової цитометрії лімфоцитів з МНКПК, підданих експансії із цитокиновим коктейлем в присутності пептидів PRDM2. Більша за розміром ліва панель зображує результати для зразка на початку експансії лімфоцитів, права панель – результати для зразка після 18 днів стимуляції. Клітинні сигнали розділяли на основі маркерів CD4/CD8. Маленькі панелі справа показують селекцію (gating) лімфоцитів та CD3⁺ клітин.

Фіг. 3 зображує аналіз методом протокової цитометрії тих самих зразків, що й на Фіг. 2. Розділення клітинних сигналів здійснювали за допомогою маркера IFN- γ та за розміром (протокова цитометрія з бічним світлорозсіюванням (SSC)).

Фіг. 4 зображує результати протокової цитометрії для зразків, одержаних експансією МНКПК із цитокиновим коктейлем і стимуляцією INO80E та UCHL3. Гейтували клітинні сигнали лімфоцитів (4a), CD3⁺ (4b) і потім розділяли на основі сигналів CD8 та CD4 (4c).

Фіг. 5 зображує продукування IFN- γ на подвійно негативній та CD8⁺ популяції після стимуляції INO80E або UCHL3.

Фіг. 6 зображує аналіз клітин МНКПК, підданих експансії із цитокиновим коктейлем та пептидами INO80E і UCHL3. Клітини, стимульовані INO80E, аналізували на продукування цитокінів CD107a (6d), CD127 (6e) та CD117 (6f).

Фіг. 7a-7f зображують результати експансії МНКПК із цитокиновим коктейлем та стимуляцією CMVpp65.

Фіг. 8 зображує результати аналізу IFN- γ після стимуляції підданих експансії клітин NY-ESO-1: Фіг. 8a та 8c - без стимуляції в день 0 та день 18, відповідно. Фіг. 8b та 8d - стимульовані NY-ESO-1 в день 0 та день 18, відповідно.

Фіг. 9 зображує продукування цитокінів для клітин, підданих експансії з МНКПК, одержаних від пацієнта з гліобластомою при стимуляції сурвівіном, знов в день 0 та день 18. Вимірюваними цитокінами є IL-2, IFN- γ та TNF- α . Фіг. 9a зображує результати для підгрупи CD4⁺T-клітин, Фіг. 9b – для підгрупи подвійно негативних T-клітин, і Фіг. 9c – для підгрупи CD8⁺T-клітин.

Фіг. 10 зображує аналіз лімфоцитів фенотипів CD45RA та CCR7 з використанням протокової цитометрії. Знов, лімфоцити вимірювали в день 0 та після 18 днів експансії із цитокиновим коктейлем.

Фіг. 11 зображує аналіз ефекту експансії на фенотипи CD4⁺ клітин (TH1/TH2) та CD8⁺T-клітин.

Фіг. 12 зображує аналіз експресії цитокінів CD107a клітинами, підданими експансії з периферичної крові пацієнта з HPV (папіломавірус людини). Фіг. 12a зображує експресію CD107a при стимуляції пептидом L1 HPV, Фіг. 12b - позитивний контроль, і Фіг. 12c показує результат без стимуляції (середовище). Процес селекції CD8⁺ T-клітин зображений на Фіг. 12d-12f.

Фіг. 13 зображує два графіки, які показують продукування IFN- γ лімфоцитів, підданих експансії без цитокіну, з IL-2, IL-15, IL-21 або IL-7 та IL-2, і стимуляцією за допомогою NY-ESO-1 або сурвівіну.

Фіг. 14 зображує три графіки, які показують продукування IFN- γ лімфоцитів, підданих експансії без цитокіну, з IL-2, IL-15, IL-21 або IL-7 та IL-2, та стимуляцією за допомогою EBNA-1, EBNA-3a, або CMVpp65.

Фіг. 15 зображує аналіз методом протокової цитометрії з визначення T_{reg} (регуляторних T-клітин), які ідентифікували до та після експансії T-клітин із цитокиновим коктейлем. Зліва направо: T-клітини гейтували на CD4⁺T-клітини і потім на CD25^{high}, що означає високу експресію рецептора IL-2 на активованих T-клітинах. Потім клітини гейтували на клітини IL-2R (високий CD125) і тестували на експресію рецептор IL-7 (CD127) та Foxp3 (внутрішньоклітинно).

Фіг. 16 зображує аналіз методом протокової цитометрії для визначення процентної частки PD-1⁺T-клітин у підгрупі CD8⁺.

Фіг. 17 зображує специфічний лізис аутологічних B-клітин, імпульсно оброблених (pulsed with) та імпульсно оброблених пептидами 1-12, підданими експансії лімфоцитами.

Фіг. 18 зображує аналіз методом протокової цитометрії МНКПК до ініційованої IL-2/IL-15/IL-21 експансії в присутності пухлина-асоційованого антигена NY-ESO-1. По-перше, гейтують CD3⁺ T-клітини, потім CD3⁺ T-клітини гейтують на CD4⁺ та CD8⁺ T-клітини.

Фіг. 19 зображує аналіз методом протокової цитометрії МНКПК до ініційованої IL-2/IL-15/IL-21 експансії в присутності пухлина-асоційованого антигена NY-ESO-1. По-перше, гейтують CD3⁺T-клітини, потім CD3⁺ T-клітини гейтують на CD4⁺ та CD8⁺ T-клітини.

Фіг. 20 зображує інфільтрацію пухлини, культивованої in vitro з цитокінами IL-2, IL-15 та IL-21 культури лімфоцитів після одного тижня інкубації.

Фіг. 21 зображує загальну функціональну схему аналізу цитотоксичності підданих експансії лімфоцитів проти аутологічних пухлинних клітин з використанням (радіоактивного) мічення (Cf

51) та вивільнення радіоактивності.

Фіг. 22 зображує результати аналізу методом протокової цитометрії лімфоцитів, підданих експансії з TIL, одержаних від пацієнтів з гліобластомою. Фігура 3(A) зображує розподіл фенотипів Т-клітин у підданих експансії TIL з 16 TIL на конкретні фенотипи: прекурсорні (CD45RA+CCR7⁺), центральної пам'яті (CD45RA-CCR7⁺), периферичної пам'яті (CD45RA-CCR7⁻), та диференційованого ефектора (CD45RA+CCR7⁻) Т-клітини, окремо для базових фенотипів CD8⁺ (ліва панель), CD4⁺ (права панель) та подвійно негативних Т-клітин (права панель). Окремі точки даних позначають процентну частку конкретного фенотипу порівняно з базовим фенотипом. Дані показують, що IL-2, IL-15 та IL-21 приводять до експансії TIL з фенотипом довготермінової пам'яті, а також прекурсорів Т-клітин – які можуть забезпечувати довготерміновий імунний захист.

Фіг. 22(B) зображує експресію маркерів активації та виснаження Т-клітин. Результати згруповані, як і на (A), за базовими фенотипами CD8⁺ (ліва панель), CD4⁺ (права панель) та подвійно негативних Т-клітин (права панель). Окремі точки даних позначають процентну частку клітин, що експресують маркер, вказаний на осі X, порівняно з базовим фенотипом. CD117 (c-kit) є маркером, асоційованим зі стовбуровими клітинами, і позначає Т-клітини з довготерміною пам'яттю, CD107a позначає маркер недавньої дегрануляції Т-клітин. Дані показують, що TIL, піддані експансії в IL-2, IL-15 та IL-21, експресують маркери (наприклад, c-kit), які забезпечують для них можливість довготермінової імунної клітинної пам'яті та імунний нагляд.

Фіг. 23 зображує результати аналізу методом протокової цитометрії лімфоцитів (TIL), підданих експансії з пухлинної тканини пацієнтів з раком підшлункової залози. Ліва панель зображує розподіл CD4⁺ Т-клітин на прекурсори (CD45RA+CCR7⁺), центральну пам'ять (CD45RA-CCR7⁺), периферичну пам'ять (CD45RA-CCR7⁻) та диференційований ефектор (CD45RA+CCR7⁻). Права панель - розподіл CD8⁺ клітин. Дані показують, що IL-2, IL-15 та IL-21 забезпечують експансію TIL з фенотипом довготермінової пам'яті, а також прекурсорів Т-клітин – які можуть забезпечувати довготерміновий імунний захист.

Фіг. 24 зображує результати аналізу методом протокової цитометрії лімфоцитів (TIL), підданих експансії з пухлинної тканини пацієнтів з раком підшлункової залози, на маркери активації та виснаження Т-клітин (4-1BB, LAG-3, TIM-3 та ін.). Результати згруповані згідно з CD4⁺/CD8⁺ фенотипами CD4⁺ (верхня панель), CD8⁺ (середня панель), DN (нижня панель). Індивідуальні точки даних позначають процентну частку клітин, що експресують маркер вказаний на осі X, порівняно з базовим фенотипом. Дані показують, що TIL експресують широкий спектр маркерів, що свідчать про сильні протипухлинні відповіді та недавню експозицію антигену. Молекула CD127 (IL-7R) медіює сильні фактори виживання Т-клітин.

Фіг. 25 зображує розподіл довжин TCR Т-клітин, підданих експансії з пухлинної тканини пацієнтів з раком підшлункової залози, визначений на основі методу ПЛР.

Фіг. 26 зображує результати аналізу внутрішньоклітинного продукування цитокінів в CD4⁺, CD8 або DN Т-клітинах у підданих експансії лімфоцитах з гліобластомного ураження. Графіки на Фіг. 7B показують процентну частку Т-клітин, продукуючих цитокіни IFN γ та TNF α після стимуляції. Фіг. 12A зображує максимальну стимуляцію PMA/іономіцином (позитивний контроль) та фонове значення для самого лише середовища. Фіг. 7B зображує результати стимуляції синтетичними пептидами, виділеними з пухлина-асоційованих антигенів, а саме, EGRvIII, NY-ESO-1 або сурвівіном. Дані показують, що піддані експансії з використанням IL-2, IL-15 та IL-21 TIL пацієнтів з гліобластомою містять Т-клітини, які реагують з низькою частотою зі звичайно використовуваними пухлина-асоційованими антигенами.

Фіг. 27 зображує результати аналізу внутрішньоклітинного продукування цитокінів в CD4⁺, CD8 або DN Т-клітинах у підданих експансії лімфоцитах з ракового ураження підшлункової залози. Графіки на Фіг. 8A показують процентну частку Т-клітин, продукуючих цитокіни IFN γ та TNF α (верхня панель) та TNF α (нижня панель) після стимуляції пухлина-асоційованими антигенами, а саме, мезотеліном, NY-ESO-1 або сурвівіном (surviving) в підгрупах CD4⁺ (зліва), CD8⁺ (посередині) та DN (справа). Фіг. 8B зображує приклади протоково-цитометричного аналізу зі стимуляцією NY-ESO-1. Т-клітини, гейтовані на CD3⁺ і потім на CD8⁺, (аналізували) з бічним розсіюванням (SSC) порівняно з продукуванням IFN γ (у верхній рамці) або TNF α (в нижній рамці). (Результати) показують, що піддані експансії з використанням IL-2, IL-15 та IL-21 TIL від пацієнтів з раком підшлункової залози демонструють сильну реактивність по відношенню до звичайно використовуваних пухлинних антигенів, наприклад, NY-ESO-1.

Фіг. 28 зображує результати аналізу внутрішньоклітинного продукування цитокінів в CD4⁺, CD8 або DN Т-клітинах у підданих експансії лімфоцитах з гліобластомного ураження після стимуляції аутологічними пухлинними клітинами. Графіки на Фіг. 9A показують процентну частку Т-клітин,

продукуючих цитокіни IFN γ та TNF α для CD4 $^{+}$ (ліва панель), CD8 $^{+}$ (середня панель) та DN T-клітин (права панель) після стимуляції аутологічними пухлинними клітинами. Фіг. 9B показує приклади протоково-цитометричного аналізу клітин, стимульованих аутологічними пухлинними клітинами. T-клітини, гейтовані на CD3 $^{+}$ і потім на CD4 $^{+}$ (у верхній рамці) або CD8 $^{+}$ (в нижній рамці), (аналізують) з бічним розсіюванням (SSC) порівняно з продукуванням IFN γ (у верхній рамці) або TNF α (в нижній рамці). (Результати) показують, що піддані експансії з використанням IL-2, IL-15 та IL-21 TIL від пацієнтів з гліобластомою демонструють сильну реактивність по відношенню до аутологічних пухлинних клітин.

Фіг. 29 зображує результати аналізу внутрішньоклітинного продукування цитокінів (шляхом вимірювання продукування TNF α лімфоцитів, підданих експансії із цитокіновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21. Верхня панель зображує позитивний контроль (максимальна стимуляція). Середня панель зображує результати продукування цитокінів для CD4 $^{+}$ гейтованих підданих експансії T-клітин у відповідь на аутологічні пухлинні клітини (зліва: усі TIL, справа: TIL, гейтовані на VB2+T-клітини). Нижня панель: фоновий рівень продукування в популяції TIL в цілому (зліва) та in the VB2+TIL (справа). Дані показують, що, переважно, піддані експансії з використанням TCR VB сімейств в IL-2, IL-15, IL-21 TIL (в даному документі: TCR VB2) спрямовані проти аутологічних пухлинних клітин.

Фіг. 30 зображує рівень INF γ у лімфоцитах, підданих експансії з панкреатичних пухлинних тканин після стимуляції. TIL+пухлина позначає стимуляцію підданих експансії лімфоцитів аутологічними пухлинними клітинами. TIL+OKT3 позначає стимуляцію лімфоцитів антитілом CD3. W6/32 є антитіло, що блокує CD8+TIL. Антитіло L243 блокує CD4+TIL. Дані показують, що піддані експансії з використанням IL-2, IL-15 та IL-21 TIL є специфічними проти аутологічної пухлини пацієнта.

Фіг. 31 зображує результат аналізу цитолітичної відповіді підданих експансії з використанням аутологічних пухлинних клітин TIL від пацієнтів з гліобластомою. Числа на осі X позначають співвідношення TIL до пухлинних клітин. Процентна частка на осі Y позначає число вбитих пухлинних клітин після 4 год. обробки підданими експансії TIL, виміряне за вивільненням радіоактивності.

Фіг. 32 зображує результат аналізу цитолітичної відповіді підданих експансії моноклональних T-клітин та/або, краще, підданих експансії TIL від пацієнтів з гліобластомою, проти аутологічних пухлинних клітин. Числа на осі X позначають співвідношення TIL до пухлинних клітин. Процентна частка на осі Y позначає число вбитих пухлинних клітин після 4 год. обробки підданими експансії TIL, виміряне за вивільненням радіоактивності.

Фіг. 33 зображує результат аналізу цитолітичної відповіді підданих експансії TIL від пацієнтів з раком підшлункової залози проти аутологічних пухлинних клітин. Числа на осі X позначають співвідношення TIL до пухлинних клітин. Процентна частка на осі Y позначає число вбитих пухлинних клітин після 4 год. обробки підданими експансії TIL, виміряне за вивільненням радіоактивності. Ці піддані експансії з використанням IL-2, IL-15 та IL-21 TIL продемонстрували дуже сфокусований репертуар TCR та виявляють сильну цитотоксичну відповідь проти аутологічних пухлинних клітин.

ДЕТАЛЬНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Автори винаходу знайшли, що комбінація інтерлейкінів IL-2, IL-15 та IL-21 забезпечує значні поліпшення імунотерапії з використанням лімфоцитів. Однією важливою перевагою є те, що експансія та стимуляція лімфоцитів, отриманих від пацієнта, з композицією, що складається з комбінації принаймні двох типів цитокінів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21, особливо сприяє генеруванню лімфоцитів, зокрема, T-клітин, які є клінічно релевантними.

Згідно з винаходом, "клінічно релевантні лімфоцити" є специфічними до та взаємодіють з клінічно релевантними антигенами. Існує три групи клінічно релевантних лімфоцитів, а саме, пухлина-реактивні лімфоцити, реактивні щодо інфекційної хвороби лімфоцити та реактивні щодо аутоімунної хвороби лімфоцити.

"Клінічно релевантні лімфоцити" також називаються антиген-відредагованими лімфоцитами. Термін клінічно релевантний також використовується для підгруп лімфоцитів. Особливо кращими клінічно релевантними лімфоцитами є клінічно релевантні T-клітини або антиген-відредаговані T-клітини.

"Клінічно релевантні антигени" згідно з винаходом є антигенами, залученими до хвороби. Відповідно, клінічно релевантні антигени можуть бути пухлина-асоційованими антигенами ТАА, патоген-асоційованими антигенами (ПАА) або аутоантигенами. Пухлина-реактивні лімфоцити є специфічними до та взаємодіють з ТАА. Реактивні щодо інфекційної хвороби лімфоцити є специфічними до та взаємодіють з ПАА, і реактивні щодо аутоімунної хвороби лімфоцити є специфічними до та взаємодіють з аутоантигенами.

Згідно з винаходом, "антиген" (Ag) є будь-якою структурною речовиною, яка служить мішенню для рецепторів адаптивної імунної відповіді, TCR або антитіла, відповідно. Антигени є, зокрема, білками, полісахаридами, ліпідами та їх субструктурами, такими як пептиди. Ліпіди та нуклеїнові кислоти є, зокрема, антигенними в комбінації з білками або полісахаридами.

"Патоген-асоційовані антигени" (PAA) стосуються частин, таких як капсули, клітинні стінки, джгутики та токсини патогенів, таких як бактерії, віруси та інші мікроорганізми.

"Аутоантигени" є звичайно пептидами, олігопептидами, поліпептидами або комплексами білків індивідуума, які розпізнаються імунною системою цього самого індивідуума. Цей ефект звичайно призводить до аутоімунної хвороби.

"Пухлина-асоційовані антигени" або "ТАА", згідно з винаходом, є антигенами, які презентуються молекулами МНС I або МНС II або неklasичними молекулами МНС на поверхні пухлинних клітин. У використовуваному в даному документі значенні, ТАА включає "пухлина-специфічні антигени", які є присутніми тільки на поверхні пухлинних клітин, але не на поверхні нормальних клітин.

За допомогою комбінації IL-2, IL-15 та IL-21 можливо специфічно індукувати проліферацію клінічно релевантних лімфоцитів у зразку з організму, одержаному від пацієнта, як показано у прикладах. Спосіб згідно з винаходом передбачає простий протокол для експансії клінічно релевантних лімфоцитів. Він, зокрема, є кращим у порівнянні з протоколами відомого рівня техніки, оскільки не потребує дендритних клітин. Крім того, автори винаходу змогли показати, що популяція лімфоцитів, одержана після експансії із цитокіновим коктейлем, що складається з комбінації принаймні двох типів цитокінів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21, містить композиція лімфоцитів, яка є кращою для клінічного застосування. Наприклад, композиція має високу процентну частку T_{H1} хелперних Т-клітин і майже не містить T_{H2} хелперних Т-клітин. Додатковою перевагою є те, що не відбувається значної експансії регуляторних Т-клітин, які можуть спричинити пригнічення терапевтичної дії підданої експансії популяції лімфоцитів.

Таким чином, згідно з першим аспектом, винахід передбачає композицію для експансії лімфоцитів, що містить принаймні два типи цитокінів, вибраних з інтерлейкіну 2 (IL-2), інтерлейкіну 15 (IL-15) та інтерлейкіну 21 (IL-21).

IL-2, IL-15 та IL-21 є членами сімейства цитокінів, кожен з яких має клубок з чотирьох альфа-спіралей. IL-2 відіграє ключову роль в ключових функціях імунної системи, переносності та імунитеті, переважно завдяки його прямому впливу на Т-клітини. IL-2 індукує проліферацію та диференціацію Т-клітин в ефекторні та Т-клітини пам'яті.

IL-15 є цитокіном, який є структурно схожим з IL-2. Як і IL-2, IL-15 зв'язується з та передає сигнали через комплекс, що складається з бета-ланцюга рецептора IL-2/IL-15. IL-15 індукує активацію та проліферацію Т-клітин, зокрема, CD8+Т-клітин (30), а також забезпечує сигнали виживання для підтримання клітин пам'яті за відсутності антигенів, кращих CD8+Т-клітин, та активує моноцити. IL-15, очевидно, запускає проліферацію імунних ефекторних Т-клітин, разом із захистом від інгібування пухлина-асоційованою імуносупресією (31).

IL-21 є цитокіном, який виявляє сильні регуляторні ефекти на клітини імунної системи, включаючи природні клітини-вбивці (NK) та цитотоксичні Т-клітини. IL-21 збагачує Т-клітини типу центральної пам'яті фенотипом CD28+CD127hi CD45RO+ та підвищує цитотоксичність цитотоксичних Т-клітин. IL-21 може підтримувати Т-клітини на ранній фазі їх диференціації та дозріванні (35).

Згідно з винаходом, композиція, що складається з комбінації принаймні двох типів цитокінів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21, також називається "цитокіновим коктейлем".

У використовуваному в даному документі значенні, "інтерлейкін 2" або "IL-2" стосується людського IL-2, як визначено у SEQ ID NO: 1, та його функціональними еквівалентами. Функціональні еквіваленти IL-2 включають релевантні субструктури або гібридні білки IL-2, які зберігають функції IL-2. Відповідно, визначення IL-2 охоплює будь-який білок з ідентичністю послідовностей з SEQ ID NO: 1 принаймні 80 %, краще, принаймні 90 %, ще краще, принаймні 95 %, найкраще, принаймні 98 %. Рекombінантний людський IL-2, продукований в *E. coli* у вигляді окремого, неглікозильованого поліпептидного ланцюга з 134 амінокислот, який має молекулярну масу 15 кДа, є комерційно доступним в ліофілізованій формі від фірми Prospec під назвою CYT-209.

У використовуваному в даному документі значенні, "інтерлейкін 15" або "IL-15" стосуються людського IL-15 та його функціональних еквівалентів. Функціональні еквіваленти IL-15 включають релевантні субструктури або гібридні білки IL-15, які зберігають функції IL-15. Відповідно, визначення IL-15 охоплює будь-який білок з ідентичністю послідовностей з SEQ ID NO: 2 принаймні 80 %, краще, принаймні 90 %, ще краще, принаймні 95 %, найкраще, принаймні 98 %. Рекombінантний людський IL-15, продукований в *E. coli* у вигляді окремого,

неглікозильованого поліпептидного ланцюга зі 114 амінокислот (та N-кінцевого метіоніну), який має молекулярну масу 12,8 кДа, є комерційно доступним в ліофілізованій формі від фірми Prospec під назвою СУТ-230.

У використовуваному в даному документі значенні, "інтерлейкін 21" або "IL-21" стосуються людського IL-21 та його функціональних еквівалентів. Функціональні еквіваленти IL-21 включають релевантні субструктури або гібридні білки IL-21, які зберігають функції IL-21. Відповідно, визначення IL-21 охоплює будь-який білок з ідентичністю послідовностей з SEQ ID NO: 3 принаймні 80 %, краще, принаймні 90 %, ще краще, принаймні 95 %, найкраще, принаймні 98 %. Рекombінантний людський IL-21, продукований в *E. coli* у вигляді окремого неглікозильованого поліпептидного ланцюга з 132 амінокислот, який має молекулярну масу 15 кДа, є комерційно доступним в ліофілізованій формі від фірми Prospec під назвою СУТ-408.

"Пептид", у використовуваному в даному документі значенні, може складатися з будь-якого числа амінокислот будь-якого типу, краще, природних амінокислот, які, краще, з'єднані пептидними зв'язками. Зокрема, пептид включає принаймні 3 амінокислоти, краще, принаймні 5, принаймні 7, принаймні 9, принаймні 12, або принаймні 15 амінокислот. Крім того, верхньої межі довжини пептиду немає. Однак, краще, довжина пептиду згідно з винаходом не перевищує 500 амінокислот, ще краще, вона не перевищує 300 амінокислот; і ще краще, вона становить не більше 250 амінокислот.

Таким чином, термін "пептид" включає "олігопептиди", що звичайно стосується пептидів з довжиною від 2 до 10 амінокислот, і "поліпептиди", що звичайно стосується пептидів з довжиною більш ніж 10 амінокислот.

Термін "білок" стосується пептиду з принаймні 60, принаймні 80, краще, принаймні 100 амінокислотами.

Термін "гібридний білок", згідно з винаходом, стосується білків, створених шляхом з'єднання двох чи більше генів, кДНК або послідовностей, які первісно кодували окремі білки/пептиди. Гени можуть бути природними та належати одному й тому самому організму або різним організмам, або можуть (бути) синтетичними полінуклеотидами.

Спорідненість між двома амінокислотними послідовностями або між двома нуклеотидними послідовностями описується параметром "ідентичність послідовностей". В цілях даного винаходу, ступінь ідентичності послідовностей між двома амінокислотними послідовностями визначається з використанням алгоритму Нідлмана-Вунша (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), реалізованого в програмі Needle пакета EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), краще, версії 3.0.0 чи пізнішої. Використовуваними необов'язковими параметрами є штраф за відкриття пробелу 10, штраф за подовження пробелу 0,5, та матриця заміщення EBLOSUM62 (варіант BLOSUM62 для EMBOSS). Вихідний параметр Needle, називаний "найдовша ідентичність" (одержаний з використанням опції -nobrief), використовується як процент ідентичності та обчислюється у такий спосіб:

$$(\text{Число ідентичних залишків} \times 100) / (\text{Довжина вирівнювання} - \text{Загальне число пробелів у вирівнюванні})$$

Перехідний термін "що містить", синонімами якого є "що включає", "що вміщує", або "який характеризується", є включним або необмежувальним та не виключає додаткові неназвані елементи або стадії способу. Перехідна фраза "що складається з" виключає будь-який елемент, стадію, або інгредієнт, не вказані в пункті формули, за винятком домішок, які звичайно асоційовані з ним. Якщо фраза "що складається з" використовується в умові до тіла пункту формули (clause of the body of a claim), а не негайно після ввідної частини, то вона обмежує лише елемент, вказаний в цій умові; інші елементи не виключаються з пункту формули в цілому. Перехідна фраза "що складається по суті з" обмежує обсяг домогань зазначеними матеріалами або стадіями "та такими, що істотно не впливають на основну та нову характеристику (характеристики)" винаходу, що заявляється. Формулювання домогання "що складається по суті з" займає проміжне положення між замкненими пунктами формули, складеними в форматі "що складається з", та повністю відкритими пунктами формули, складеними в форматі "що містить".

"Експансія" або "клональна експансія", у використовуваному в даному документі значенні, означає продукування дочірніх клітин, які усі походять від однієї клітини. При клональній експансії лімфоцитів, усе потомство має одну й ту саму антигенну специфічність.

Згідно з одним варіантом втілення винаходу, композиція згідно з першим аспектом охоплює два або три типи цитокінів. Додаткові цитокіни можуть впливати на результати експансії, забезпечувані композицією згідно з винаходом.

Альтернативно, інші цитокіни, використовувані на додаток до комбінації IL-2, IL-15 та IL-21,

можуть позитивно впливати на популяцію лімфоцитів. Таким чином, композиція за першим аспектом винаходу може містити більше цитокінів на додаток до IL-2, IL-15 та IL-21. Прикладами є IL-1 β , IL-4, GM-CSF, IL-12, IL-8, IL-17, TNF α , IL-32. IL-1 β є залученим до приміювання, диференціації в ефекторні В-клітини або Т-клітини при першому контакті зі специфічним антигеном. IL-4 та GM-CSF залучені до стимуляції та/або приміювання дендритних клітин. IL-12 залучений до відповіді T_H1. IL-18 стимулює $\gamma\delta$ -Т-клітини. IL-17 та TNF α виявляють прозапальну дію. IL-32 також виявляє прозапальну дію, сприяючи довготерміновим захисним імунним відповідям.

Згідно з одним варіантом втілення першого аспекту, композиція включає IL-2 та IL-15. Композиція може також включати IL-2 та IL-21. Альтернативно, композиція може включати IL-15 та IL-21. Хоча вже двох з цитокінів IL-2, IL-15 та IL-21 може бути досить для одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів, в композиції краще використовують усі три цитокіни.

Згідно з додатковим варіантом втілення, композиція за першим аспектом має рідку форму. Зокрема, композиція є середовищем клітинної культури. Згідно з винаходом, будь-яке відоме середовище клітинної культури є можливим. Необмежувальними прикладами середовищ клітинних культур є синтетичне середовище, середовище, одержане із сироватки, плазми або цільної крові, або будь-яка їх комбінація.

Згідно з додатковим варіантом втілення, концентрація IL-2 в рідкій композиції має значення в діапазоні від 10 до 6000 МО/мл. Міжнародна одиниця (МО, U) є стандартною мірою для кількості (ог) IL-2. Вона визначається як здатність індукувати проліферацію клітин CTLL-2. Концентрація нижче 10 МО/мл є занадто низькою для досягнення скільки-небудь значного ефекту. Концентрація вище 6000 МО/мл може мати цитотоксичний ефект. Концентрація IL-2, краще, має значення в діапазоні від 500 до 2000 МО/мл. Ще краще, концентрація IL-2 має значення в діапазоні від 800 до 1100 МО/мл. Як показано у прикладах, оптимальні результати були досягнуті при концентрації приблизно 1000 МО/мл.

Згідно з додатковим варіантом втілення першого аспекту, концентрація IL-15 має значення в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл. Діапазон концентрацій визначається за такими саме принципами, як і для IL-2. Концентрація нижче 0,1 нг/мл вважається такою, що не має скільки-небудь значного ефекту на клітини. Концентрація вище 100 нг/мл може мати цитотоксичний ефект. Краще, концентрація IL-15 має значення в діапазоні від 2 до 50 нг/мл, ще краще, в діапазоні від 5 до 20 нг/мл. Найкраща концентрація становить приблизно 10 нг/мл.

В додатковому варіанті втілення, концентрація IL-21 має значення в діапазоні від 0,1 нг/мл, краще, в діапазоні від 2 до 50 нг/мл, ще краще, в діапазоні від 5 до 20 нг/мл.

Слід розуміти, що, згідно з винаходом, будь-який з цих діапазонів концентрацій одного з цитокінів може бути скомбінованим з будь-яким з діапазонів концентрацій інших цитокінів.

Згідно з одним варіантом втілення, комбінація включає суміш IL-15 та IL-21. Суміш включає, краще, кожен з IL-15 та IL-21 в діапазоні значень від 10 до 100 нг/мл. IL-15 та IL-21 можуть забезпечувати синергічні ефекти, особливо, на підгрупи лімфоцитів в популяціях прекурсорів, пам'яті та ефекторів.

Згідно з одним варіантом втілення першого аспекту, комбінація включає IL-2 в концентрації від 800 до 1000 МО/мл та IL-15 і IL-21 в концентрації від 5 до 20 нг/мл. Згідно з іншим варіантом втілення, композиція включає IL-2 в концентрації приблизно 1000 МО/мл і IL-15 та IL-21 в концентрації приблизно 10 нг/мл.

Композиція IL-2, IL-15 та IL-21, зокрема, є корисною для промотування експансії клінічно релевантних лімфоцитів в композиції лімфоцитів, зокрема, в зразку від пацієнта. Як показано у прикладах, автори винаходу розробили спосіб одержання специфічних клінічно релевантних лімфоцитів із зразка від пацієнта.

Композиція IL-2, IL-15 та IL-21, зокрема, є корисною для промотування експансії клінічно релевантних лімфоцитів в композиції лімфоцитів, зокрема, у зразку від пацієнта. Як показано у прикладах, автори винаходу розробили спосіб, що зменшує частоту PD1 та LAG3+Т-клітин, у якому експресія PD1 та/або LAG3 служить маркером for виснаження Т-клітин, а не маркером "навчених" антигеном Т-клітин.

Композиція IL-2, IL-15 та IL-21, зокрема, є корисною для промотування експансії клінічно релевантних лімфоцитів в композиції лімфоцитів, зокрема, в зразку від пацієнта. Як показано у прикладах, автори винаходу розробили спосіб, який підвищує частоту експресії 4-1BB як маркер "навчених" антигеном Т-клітин.

Таким чином, згідно з другим аспектом, винахід передбачає спосіб одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів, який включає стадії:

одержання зразка з організму ссавця, зокрема, зразка тканини або зразка рідини організму, що містить принаймні один лімфоцит та, необов'язково, виділення клітин в зразку з організму,

культивувації зразка з організму *in vitro* для експансії та/або стимуляції лімфоцитів у зразку, причому культивування включає використання принаймні двох типів цитокінів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21, і, необов'язково, визначення присутності клінічно релевантного лімфоцита у культивованому зразку.

5 Принаймні два типи цитокінів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21, краще, використовують в концентраціях, визначених вище. краще, усі all три цитокіни IL-2, IL-15 та IL-21 використовують разом.

Як показано у прикладах, спосіб може бути використаний для генерування популяції пухлина-реактивних лімфоцитів, реактивних щодо аутоімунної хвороби лімфоцитів або реактивних щодо інфекційної хвороби лімфоцитів. Краще, популяція лімфоцитів, згенерована способом за другим аспектом, є популяцією пухлина-реактивних лімфоцитів.

10 Лімфоцити загалом будуть включати різноманітні лімфоцити. Поміж цих лімфоцитів можуть бути присутні лімфоцити, які мають рецептор, необхідний для взаємодії з клінічно релевантним антигеном, зокрема, пухлина-асоційованим антигеном, антигеном, асоційованим з інфекційною хворобою або антигеном, асоційованим з аутоімунною хворобою. За допомогою способу за винаходом, цей клінічно релевантний лімфоцит, зокрема, в сильному ступені піддають експансії. Однак, інші лімфоцити, які не мають специфічності до клінічно релевантного антигена, також піддають експансії у способі згідно з винаходом.

Таким чином, результат культивування клітин із зразка з організму з композицією, що містить IL-2, IL-15 та/або IL-21, приводить до утворення популяції лімфоцитів, яка включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів. Визначення присутності клінічно релевантних лімфоцитів у культивованому зразку є можливою, але не обов'язковою стадією способу згідно з другим аспектом винаходу. Стадії, придатні для перевірки популяції підданих експансії лімфоцитів, насправді можуть бути використані як терапевтичні.

25 Зразок з організму може бути взятий з будь-якої частини тіла, що містить лімфоцити. Прикладами зразків з організму є периферична кров, пуповинна кров, кістковий мозок, лімфатичні вузли, печінка(,) плевральний випіт, грудна клітина, черевна порожнина, синовіальна рідина, очерешина, ретроперитонеальний простір, виличкова залоза та пухлина.

Зразок лімфоцитів, виділений з пухлини, також називається інфільтруючими пухлину лімфоцитами (TIL). "TIL", у використовуваному в даному документі значенні, є скороченням від "інфільтруючі пухлину лімфоцити" (tumor infiltrating lymphocytes). TIL є будь-яким видом лімфоцитів, які розташовані в, на або навколо пухлини. TIL є будь-яким видом лімфоцитів, розташованих в та навколо пухлини.

Через свою локалізацію в пухлині, TIL можуть мати "навчені" пухлина-асоційовані антигени. Відповідно, клінічно релевантні лімфоцити, зокрема, пухлина-реактивні лімфоцити, можуть бути піддані експансії з використанням способу за винаходом без експансії антигена.

Зразок з периферичної крові також називається мононуклеарними клітинами периферичної крові (МНКПК). В залежності від типу хвороби, кращими можуть бути різні зразки з організму.

У використовуваному в даному документі значенні, термін "ссавець" стосується будь-якого ссавця, включаючи, без обмежень, ссавців з ряду гризунів, таких як миші та хом'ячки, та ссавців з ряду зайцеподібних, таких як кролики. Краще, ссавці належать до ряду хижих, включаючи котятих (кішок) та собачих (собак). Ще краще, ссавці належать до ряду парнокопитих, включаючи бичачих (велика рогата худоба) та свиней (свині) або до ряду непарнокопитих, включаючи конячих (коні). Найкраще, ссавці належать до ряду приматів, широконосих мавп, або вузьконосих мавп (мартішки) або до ряду людиноподібних (люді та людиноподібні мавпи). Особливо краще, ссавець є людиною.

Згідно з одним варіантом втілення другого аспекту, ссавець від якого отримують зразок з організму, є людиною. Ссавець може мати онкологічну хворобу, або мати ризик розвитку онкологічної хвороби. Ризик розвитку онкологічної хвороби включає високий ризик, помірний ризик та низький ризик. Ссавець в такому передпухлинному стані, наприклад, має передпухлинне ушкодження, яке є морфологічно атипичною тканиною, яка виглядає аномальною при мікроскопічних дослідженнях, та у якій виникнення раку є більш імовірним, ніж в її очевидно нормальному аналізі.

Крім того, ссавець може мати інфекційну хворобу або мати ризик розвитку інфекційної хвороби. Ризик розвитку інфекційної хвороби включає високий ризик, помірний ризик та низький ризик. Ссавець може також мати аутоімунну хворобу або мати ризик розвитку аутоімунної хвороби. Ризик розвитку аутоімунної хвороби включає високий ризик, помірний ризик та низький ризик. Наприклад, високий ризик розвитку внутрішньоклітинних інфекцій (цитомегаловірус (CMV), вірус Епштейна-Барр (EBV), туберкульоз (TB), папіломавірус людини (HPV)) (існує) при певних генетичних мутаціях у хазяїна (дефекти рецептора IFN γ , або набуті антитіла, спрямовані

проти цитокінів, наприклад, IL-12 або IFN γ). Проміжним ризиком буде імуносупресія з використанням кортикостероїдів або лікування пацієнтів з використанням реагентів, спрямованих проти TNF α (фактор некрозу пухлини α) або рецептора TNF α . Низький ризик може бути коінфекція іншими патогенами або тимчасове зниження імунокомпетентності під час

5 "великої" операції. Аналогічними прикладами є різні клінічні прояви – у поєднанні з генетичними маркерами - розсіяного склерозу, рідких неврологічних хвороб, наприклад, нарколепсії, ревматоїдного артриту, а також хронічних аутоімунних хвороб, асоційованих із шлунково-кишковою системою.

10 Якщо ссавець має онкологічну хворобу або має високий ризик розвитку онкологічної хвороби, кращим зразком з організму є периферична кров або сама пухлина. Як показано у прикладах, лімфоцити з периферичної (крові) та пухлини можуть бути оброблені у спосіб за винаходом для розвинення сильних протипухлинних властивостей. Якщо хвороба є аутоімунною хворобою, кращим зразком з організму є периферична кров. Крім того, коли хвороба є інфекційною хворобою, кращим зразком з організму є також периферична кров. Як

15 показано у прикладах, клінічно релевантні лімфоцити можуть бути піддані експансії з периферичної крові в цих випадках. Без обмеження теорією, вважається, що периферична кров містить лімфоцити, які перебували в контакт з клінічно релевантним антигеном, наприклад, у пухлині або при інфекції.

20 Культивування зразка з організму *in vitro* для експансії та/або стимулювання лімфоцитів може включати одну чи декілька підстадій. Відповідно, в одному варіанті втілення, *in vitro* культивування включає першу стадію експансії, яка включає інкубацію в культуральному середовищі, що містить IL-2, IL-15 та IL-21, поки лімфоцити не стануть детектованими.

25 "Детектовані", згідно з винаходом, означає, що лімфоцити, наприклад, стають видимими, зокрема, шляхом мікроскопії. Лімфоцити звичайно стають детектованими з використанням стандартно світлової мікроскопії після досягнення концентрації 5×10^3 клітин/мл.

Детектування лімфоцитів може включати будь-який спосіб, відомий фахівцям, який є придатним для детектування присутності лімфоцитів вище певного порогового значення. Метою першої стадії експансії є м'яке індукування проліферації клітин разом зі стимуляцією клітини цитокіновим коктейлем.

30 Час інкубації першої стадії експансії має значення в діапазоні від 6 годин до 180 днів. Великий діапазон часів інкубації, насамперед, пояснюється тим, що зразки від різних донорів можуть поводитися дуже по-різному. Також було показано, що лімфоцити з різних зразків з організму мають дуже різні швидкості росту. Наприклад, лімфоцити, одержані безпосередньо з пухлини гліобластоми або раку підшлункової залози ростуть дуже по-різному. Лімфоцити,

35 одержані з раку підшлункової залози, стають детектованими вже через два-п'ять днів. Лімфоцити, одержані з гліобластоми, детектуються лише через один-два тижня. Відповідно, лімфоцити з інших зразків з організму можуть потребувати ще більшого часу, щоб стати детектованими.

40 Краще, час інкубації першої стадії експансії має значення в діапазоні від 4 днів до 10 днів. Було показано, що для клітин периферичної крові час інкубації близько 7 днів є особливо корисним з погляду результату іншої (other) експансії. Однак, як згадувалося вище, в залежності від зразка, експансія протягом усього лише 4 днів може бути достатньою, або, з іншого боку, приблизно 10 днів чи більше можуть бути потрібними. На підставі гарних результатів, одержаних для МНКПК у прикладах, час інкубації в діапазоні від 6 до 8 днів, зокрема, близько

45 семи днів, є кращим.

Згідно з одним варіантом втілення винаходу, культуральне середовище першої стадії експансії включає принаймні один антиген для проведення експансії. Антиген для проведення експансії є відомим клінічно релевантним антигеном або його фрагментом, мутантом або варіантом. У використовуваному в даному документі значенні, "мутант" визначається як

50 амінокислотна послідовність, що відрізняється від референсної послідовності інсерцією, делецією або заміщенням принаймні однієї амінокислоти. Антиген для проведення експансії, краще, вибраний з ТАА, РАА та аутоантигена.

Краще, спосіб згідно з винаходом включає численні копії антигена для проведення експансії. Підвищене число копій антигена для проведення експансії приводить до підвищеної швидкості експансії клінічно релевантного лімфоцита, зокрема, Т-клітин.

55 В одному варіанті втілення винаходу, культуральне середовище першої стадії експансії включає численні антигени для проведення експансії. Краще, численні антигени для проведення експансії включають відомий клінічно релевантний антиген та один чи декілька мутантів клінічно релевантного антигена. Замість самого антигена, можуть бути мутовані також (молекула) МНС класу I/пептид, що презентує антиген, зокрема, пептид. Використання одного

60

чи декількох дикого типу, варіантів або мутантів клінічно релевантного антигена або молекул МНС класу I як антигенів для проведення експансії приводить до одержання набору різноманітних лімфоцитів, зокрема, Т-клітин, реактивних по відношенню до номінально клінічно релевантного антигена.

5 Згідно з кращим варіантом втілення способу згідно з другим аспектом, зразок з організму є пухлиною і при культивуванні не використовується жодного антигена для проведення експансії.

Пухлинну тканину, краще, промивають двічі перед виділенням клітин зі зразка пухлини.

В іншому кращому варіанті втілення винаходу, культуральне середовище першої стадії експансії включає численні антигени для проведення експансії. Завдяки наявності численних антигенів, Т-клітини продукту реагують на більш різноманітний репертуар Т-клітинних рецепторів, на що вказує використання (рецептора) $V\beta$, асоційоване із застосуванням стимулюючого антигена (антигенів).

В іншому кращому варіанті втілення винаходу, культуральне середовище першої стадії експансії включає численні антигени для проведення експансії. Стимуляція Т-клітин з периферичної крові приводить до одержання Т-клітин, які розпізнають різноманітні епітопи, як було визначено (за допомогою аналізів) цитотоксичності (cytotoxicity). Коли наївні Т-клітини брали з крові та стимулювали такими антигенами, це приводило до розпізнавання ними різноманітних епітопів антигена.

20 Це відрізняється від попередньо стимульованих Т-клітин або Т-клітин з пухлини, які мають схильність розпізнавати більш обмежене число або стандартне число епітопів.

Вибір антигена для проведення експансії залежить від хвороби, яку треба лікувати. Зокрема, якщо піддана експансії популяція клінічно релевантних лімфоцитів має використовуватися проти онкологічних хвороб, антигеном для проведення експансії, який додають на першій стадії експансії, краще, є ТАА. Альтернативно, якщо хвороба, яку треба лікувати, є інфекційною хворобою, антигеном для проведення експансії, який додають на першій стадії експансії, є РАА. Крім того, якщо популяція клінічно релевантних лімфоцитів має бути використана для лікування аутоімунної хвороби, антигеном для проведення експансії, краще, є аутоантиген.

30 Вважається, що антиген для проведення експансії на першій стадії експансії приводить до стимуляції клінічно релевантних лімфоцитів у суміші клітин вже на ранній стадії і таким чином разом із цитокиновим коктейлем підсилює експансію клінічно релевантних лімфоцитів. Така стимуляція також називається антигенною активацією або антигенним редагуванням.

35 За першою стадією експансії може йти друга стадія експансії, на якій клітини інкубують із живильними клітинами та/або антитілом проти CD3 на додаток до принаймні двох типів цитокинів, вибраних з IL-2, IL-15 та IL-21. Експансія із живильними клітинами та антитілом проти CD3 була описана у відомому рівні техніки. Вважається, що живильні клітини приводять до поліпшення росту клітин. Живильні клітини є опроміненими клітинами, які не проліферують або проліферують лише в незначному ступені. Живильні клітини збільшують число клітинних контактів у культурі та додатково живлять клітинну культуру, яка проліферує та розмножується. Живильні клітини, краще, є опроміненими МНКПК. Алогенні (клітини-)фідери походять з організму, відмінного від ссавця, якого будуть лікувати підданими експансії клінічно релевантними лімфоцитами. Аутологічні живильні клітини походять від ссавця, якого треба лікувати.

45 Антитіло проти CD3, краще, є антитілом, визначеним як ОКТ3. ОКТ3 є мишачим моноклональним антитілом, що належить до ізотипу імуноглобуліну IgG2a. Мішень ОКТ3, CD3, є мультимолекулярним комплексом, присутнім лише в зрілих Т-клітинах. Взаємодія між Т-клітинами, ОКТ3 та моноцитами спричинює *in vitro* активацію Т-клітин.

50 Краще, живильні клітини використовують в комбінації з CD3 та цитокинами IL-2, IL-15 та IL-21. Відповідно до одного варіанта втілення способу згідно з другим аспектом, співвідношення живильних клітин до лімфоцитів має значення в діапазоні від 1:1 до 1:100. Краще, співвідношення (the ration) живильних клітин до лімфоцитів має значення в діапазоні від 1:2 до 1:50. Як показано у прикладах, дуже низькі співвідношення живильних клітин є достатніми для сильної експансії клінічно релевантних лімфоцитів, зокрема, клінічно релевантних Т-клітин.

55 У прикладах, співвідношення 1:10 є достатнім для підтримування росту та експансії лімфоцитів. Відповідно, вважається, що величина в діапазоні від 1:5 до 1:20 не буде приводити до відмінного результату. Низьке число живильних клітин має принаймні дві переваги. По-перше, зменшується кількість відволікаючих клітинних сигналів, що дозволяє одержати більш однорідні та надійні результати експансії. По-друге, менша кількість живильних клітин приводить до меншої кількості екзогенного матеріалу в продукті для імунотерапії, одержаному цим способом, тобто, в популяції клінічно релевантних лімфоцитів.

60 Друга стадія експансії, необов'язково, також включає антиген для проведення експансії в

культуральному середовищі. Краще, ніякі клінічно релевантні антиген або фрагмент не додаються до середовища другої стадії експансії.

Згідно з кращим варіантом втілення другого аспекту винаходу, спосіб включає стадію перефокусування. Стадія перефокусування включає культивування в культуральному середовищі, що містить клітини для проведення перефокусування. Клітини для проведення перефокусування є клітинами ссавця, від якого одержують зразок з організму, зокрема, людини. Відповідно, клітини для проведення перефокусування є аутологічними клітинами, які були оброблені принаймні одним антигеном для проведення перефокусування. Будь-який антиген для проведення експансії, як визначено в даному документі, може бути також використаний як антиген для проведення перефокусування. Краще, у способі один чи декілька антигенів для проведення перефокусування є ідентичними з одним чи декількома антигенами для проведення експансії.

Клітини для проведення перефокусування є клітинами, які були інкубовані з антигеном для проведення перефокусування протягом принаймні 30 хвилин чи більше, наприклад, принаймні однієї години, принаймні двох годин, принаймні п'яти годин, або принаймні десяти годин. Після інкубації з (клітинами) для проведення перефокусування, клітини для проведення перефокусування опромінюють дозою принаймні 40 Гр. Краще, клітини опромінюють дозою принаймні 45 Гр чи більше, приклад, принаймні 50 Гр, особливо краще, з інтенсивністю 55 Гр. Завдяки цій обробці, антиген-специфічні Т-клітини більш ефективно піддають експансії, розпізнають пухлину, патогени або аутоімунні клітини і можуть забезпечувати захист проти ракових клітин або передпухлинних уражень.

Час стадії перефокусування має значення в діапазоні від 1 до 6 днів, краще, від 1 до 3 днів. Хоча стадія перефокусування може бути досить короткою, вона приводить до значного поліпшення виходу підданих експансії клінічно релевантних лімфоцитів, зокрема, для клінічно релевантних лімфоцитів, підданих експансії з периферичної крові.

Також, число клітин для проведення перефокусування у порівнянні з числом лімфоцитів є досить низьким. Зокрема, співвідношення клітин для проведення перефокусування до лімфоцитів має значення в діапазоні від 1:1 до 1:100. Було знайдено, що найкращі результати досягаються, якщо стадію перефокусування проводять одразу після першої стадії експансії, та після неї проводять другу стадію експансії. Послідовність стадій культивування є, зокрема, корисною для генерування популяції клінічно релевантних лімфоцитів, зокрема, Т-клітин.

Згідно з одним варіантом втілення способу, перша стадія експансії включає додавання IL-2, IL-15 та IL-21 одночасно до клітинної культури. Для цього, можна приготувати суміш IL-2, IL-15 та IL-21 та додати її до середовища клітинної культури, або IL-2, IL-15 та IL-21 додають окремо, але одночасно, до середовища клітинної культури. Як показано у прикладах, одночасне додавання IL-2, IL-15 та IL-21 приводить до кращої композиції лімфоцитів у популяції лімфоцитів, підданих експансії.

Для зміни складу композиції підданої експансії популяції лімфоцитів можна у способі за винаходом додати спочатку тільки IL-21 до середовища клітинної культури на першій стадії експансії. Після додавання IL-21, IL-15 та IL-2 можуть бути додані одночасно або послідовно. Краще, IL-15 додають другим і IL-2 додають останнім. В альтернативному варіанті втілення, IL-15 додають як перший цитокін, з подальшим одночасним додаванням IL-2 та IL-21 або послідовним додаванням IL-2 та IL-21. Наприклад, IL-21 додають другим і IL-2 додають останнім.

Культуральне середовище першої та/або другої стадії експансії може включати принаймні один антиген для проведення експансії. Антиген для проведення експансії може, наприклад, бути фрагментом відомого TAA. Можливими TAA для використання як антигени для проведення експансії є, наприклад, NY-ESO-1, пухлинний антиген тирозиназа, тирозиназа-асоційований білок (TRP)-1, TRP-2, VEGFR-2, та член сімейства білків MAGE, теломераза, p53, HER2/neu, мезотелін, карциноембріональний (антиген), сурвівін, EGFRvIII, VEGF, антиген CAMPATH 1, CD22, CA-125, муцин-1, альфа-1-фетопротейн (fetoprotein), PSMA.

Фрагмент TAA є, зокрема, пептидом. Такий пептид може бути, наприклад, пептидом, що містить принаймні вісім послідовних амінокислот амінокислотної послідовності, яка є принаймні на 80 % ідентичною з амінокислотою послідовністю SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 4 є амінокислотою послідовністю відомого пухлина-асоційованого антигена NY-ESO-1. SEQ ID NO: 5 є амінокислотою послідовністю відомого пухлина-асоційованого антигена сурвівіну. SEQ ID NO: 6 є амінокислотою послідовністю відомого пухлина-асоційованого антигена мезотеліну. SEQ ID NO: 7 є амінокислотою послідовністю пухлина-асоційованого антигена EGFRvIII.

Антиген для проведення експансії може, наприклад, бути фрагментом відомого РАА. Можливими РАА для використання як антигени для проведення експансії є, наприклад, CMVpp65 або EBV (EBNA-3, EBNA-1), HPV-16/33 E6, E7 або L1. Фрагмент РАА є, зокрема, пептидом. Такий пептид може бути, наприклад, пептидом, що містить принаймні вісім

5 послідовних амінокислот амінокислотної послідовності, яка є принаймні на 80 % ідентичною з амінокислотною послідовністю SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, або SEQ ID NO: 11, які є амінокислотними послідовностями відомих патоген-асоційованих антигенів CMVpp65, EBNA-3, EBNA-1 та HPV-L1, відповідно.

Антиген для проведення експансії може, наприклад, бути фрагментом відомого РАА. Можливими аутоантигенами для використання як антигени для проведення експансії є, наприклад, PRDM2, UCHL3, INO80E, SLC12A6 та рілін (reelin). Фрагмент РАА є, зокрема, пептидом. Такий пептид може бути, наприклад, пептидом, що містить принаймні вісім

10 послідовних амінокислот амінокислотної послідовності, яка є принаймні на 80 % ідентичною амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, або SEQ ID NO: 15, які є амінокислотними послідовностями аутоантигенів PRDM2, INO80E, UCHL3 та DNaseB, відповідно.

Додаткові компоненти, такі як додаткові цитокіни, можуть бути додані під час стадії культивування, зокрема, на першій або другій стадіях експансії або стадії перефокусування.

Крім того, промоторна сполука може бути додана на стадії культивування, зокрема, на першій або другій стадіях експансії або на стадії перефокусування. Краще, промоторну сполуку додають на першій стадії експансії. Промоторна сполука, у використовуваному в даному документі значенні, є сполукою, яка в процесі експансії спричинює збільшення специфічної підгрупи лімфоцитів. Кращою промоторною сполукою є золедронова кислота. Золедронова кислота промотує експансію гамма-дельта Т-клітин. Додатковою кращою промоторною

20 сполукою є (така, що) промотує експансію В-клітин.

Згідно з одним варіантом втілення, на стадії культивування, зокрема, на першій або другій стадіях експансії або на стадії перефокусування, додають ко-стимулюючу сполуку. Ко-стимулююча сполука є, наприклад, лігандом CD28, що медіює Т-клітинні сигнали. Приклади лігандів CD28, що медіюють Т-клітинні сигнали, є члени суперсімейства B7, зокрема B7-1 (CD80) та B7-2 (CD86).

25

Відповідно до одного варіанта втілення способу згідно з другим аспектом, тестування присутності клінічно релевантних лімфоцитів у підданому експансії зразку лімфоцитів включає використання антигенів для проведення оцінки.

Для тестування, популяцію лімфоцитів інкубують з антигенами для проведення оцінки. Антиген для проведення оцінки може бути антигеном, який відповідає визначенню антигена для проведення експансії. Наприклад, відомий клінічно релевантний антиген або його фрагмент додають як антиген для проведення оцінки до культурального середовища популяції лімфоцитів для стимулювання лімфоцитів. Після періоду інкубації вимірюють параметр, який показує активацію клінічно релевантних лімфоцитів.

30

Краще, антиген для проведення оцінки додають до лімфоцитів у формі, зв'язаних з комплексом МНС I. Наприклад, антигени для проведення оцінки можуть бути презентовані лімфоцитам зв'язаними з декстрамерами МНС. Декстрамери МНС є флуоресцентно міченими мультимерами МНС, зв'язаними з декстрозним основним ланцюгом.

Використання мультимерних структур МНС має ту перевагу, що численні копії антигена можуть бути презентовані одному лімфоциту, тим самим підвищуючи стимуляцію (simulation) антигеном для проведення оцінки. Альтернативно, відомі клінічно релевантні антигени можуть бути презентовані культивованому зразку як антигени для проведення оцінки у формі клітин, що експресують клінічно релевантний антиген як трансген. Додатково, можна додавати принаймні частково генетично підібрані алогенні клітини, які презентують клінічно релевантні антигени на

45

50 клітинній поверхні підданим експансії лімфоцитам.

Параметром, який показує присутність клінічно релевантних лімфоцитів, може бути, наприклад, продукування одного чи декількох цитокінів, зокрема, IFN- γ , або продукування TNF α . Додатковими параметрами, що показують присутність клінічно релевантних лімфоцитів, є підвищена проліферація клітин, підвищена цитотоксичність, підвищена клітинна сигналізація та/або внутрішньоклітинне фосфорилування. Визначення цих параметрів є відомим фахівцям та пояснюється у прикладах.

55

Краще, на додаток до використання антигенів для проведення оцінки, виділених з відомих клінічно релевантних антигенів, можна також проводити тестування на клінічно релевантні лімфоцити, специфічні для ссавця, якого треба лікувати. Для цього клітини, зокрема, пухлинні клітини, одержані від того ж самого ссавця, що й піддані експансії лімфоцити, використовують

60

для презентування антигенів для проведення оцінки. Використання таких аутологічних клітин для презентації антигенів при проведенні оцінки дозволяє перевірити присутність клінічно релевантних лімфоцитів, специфічних до клінічно релевантних антигенів, які не обов'язково є відомими клінічно релевантними антигенами.

5 В одному варіанті втілення згідно з другим аспектом винаходу, антигени для проведення оцінки, які проезентують культивованому зразку, мають форму, вибрану з клітин, зокрема, пухлинних клітин, одержаних від того ж самого ссавця, що й культивований зразок (аутологічні клітини), які принаймні частково генетично відповідають алогенним клітинам, зокрема, пухлинним клітинам, або клітинам, що експресують клінічно релевантні антигени як трансген.

10 Згідно з додатковим варіантом втілення, спосіб тестування присутності клінічно релевантних лімфоцитів включає введення в контакт лімфоцитів з принаймні одним антигеном для проведення оцінки та визначення зміни будь-чого одного з продукування цитокінів, зокрема, IFN- γ , або продукування TNF α , проліферації клітин, цитотоксичності, сигналізації та/або внутрішньоклітинного фосфорилування.

15 Тестування цих параметрів може бути скомбіноване з протоковою цитометрією та сортуванням клітин. Відповідно, можна також виділити популяцію клінічно релевантних лімфоцитів, зокрема, популяцію пухлина-реактивних лімфоцитів з підданої експансії популяції лімфоцитів. Виділена популяція клінічно релевантних лімфоцитів може додатково культивуватися або бути безпосередньо використаною для імунотерапії.

20 Спосіб за другим аспектом винаходу приводить до утворення популяції лімфоцитів, яка включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів. Клінічно релевантні лімфоцити у складі підданої експансії популяції лімфоцитів можуть бути будь-яким типом лімфоцитів.

Лімфоцити включають В-клітини, природні клітини-вбивці та Т-клітини. Згідно з одним варіантом втілення, клінічно релевантний лімфоцит є В-клітиною. Згідно з одним варіантом втілення, клінічно релевантний лімфоцит є природною клітиною-вбивцею.

25 Згідно з третім аспектом, винахід передбачає клінічно релевантні лімфоцити, одержані способом згідно з другим аспектом, у якому клінічно релевантний лімфоцит є Т-клітиною, природною клітиною-вбивцею або В-клітиною.

Т-клітина, краще, вибрана з хелперної Т-клітини (T_H-клітини або CD4⁺-Т-клітини), зокрема, T_{H1}-клітини, цитотоксичної Т-клітини (T_C-клітини або CD8⁺-Т-клітини), зокрема, CD8⁺CXCR3⁺-Т-клітини, Т-клітини пам'яті, зокрема, Т-клітини центральної пам'яті (T_{CM}-клітини), Т-клітини пам'яті стовбурових клітин (T_{SCM}-клітини) або клітини периферичної пам'яті (T_{PM}-клітини), гамма-дельта Т-клітини ($\gamma\delta$ -Т-клітини), природної Т-клітини-вбивці, інваріантної Т-клітини слизової оболонки (MAIT), подвійно негативної Т-клітини (CD3⁺CD4⁺CD8⁻-Т-клітини).

35 Згідно з одним варіантом втілення, клінічно релевантний лімфоцит є лімфоцитом, який експресує молекули, що сприяють проникненню в тканини, зокрема, пухлину або інфіковану або запалену тканину (наприклад, CXCR3). Згідно з додатковим варіантом втілення, клінічно релевантний лімфоцит є лімфоцитом, який є збагаченим маркерами будь-якої довготермінової пам'яті, зокрема, CD117 та c-kit та цитолітичних імунних клітинних відповідей, зокрема, CD107a. Як було пояснено, піддана експансії популяція лімфоцитів не лише містить клінічно релевантні лімфоцити, але також і інші лімфоцити, які не розпізнають клінічно релевантні антигени.

40 Вважається, що клінічно релевантні та інші лімфоцити в культурі, одержаній способом згідно з другим аспектом, беруть участь в терапевтичному ефекті. Згідно з одним варіантом втілення третього аспекту, винахід стосується лімфоцита, одержаного способом згідно з другим аспектом, який експресує молекули та цитокіни, що промотують утворення комбінації лімфоцитів, придатної для медичного застосування, включаючи імунотерапію. Комбінація лімфоцитів, придатних для медичного застосування, краще, включає прекурсори Т-клітин, клітини T_{CM}, T_{SCM} та/або T_{PM}.

50 Згідно з одним варіантом втілення, лімфоцит, одержаний способом згідно з другим аспектом, експресує молекули та цитокіни, що промотують експансію клінічно релевантних лімфоцитів. Згідно з додатковим варіантом втілення, лімфоцит, одержаний способом згідно з другим аспектом, продукує цитокіни, вибрані з IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-17 та будь-якої їх комбінації. Згідно з одним варіантом втілення, лімфоцит є CD3⁺CD4⁺CD8⁻-Т-клітиною.

55 Згідно з четвертим аспектом, даний винахід передбачає популяцію лімфоцитів, одержаних відповідно до другого аспекту винаходу, яка включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів.

Популяція лімфоцитів може складатися з популяції клінічно релевантних лімфоцитів. Популяція клінічно релевантних лімфоцитів може бути моноклональною, олігоклональною або поліклональною.

60 В одному варіанті втілення, популяція клінічно релевантних лімфоцитів є поліклональною та

відповідає на численні антигени або на різні епітопи одного й того самого антигена. Краще, популяція клінічно релевантних лімфоцитів відповідає на різні антигени.

Лімфоцити, зокрема, Т-клітини, що відповідають на численні антигени, можуть запобігати ризику рецидиву передпухлинних клітин, пухлинних клітин та патогенів, тим самим знижуючи ризик ухиляння від імунної відповіді.

Популяція лімфоцитів згідно з четвертим аспектом складається з лімфоцитів різних фенотипів, зокрема, фенотипів Т-клітин, які є корисними для імунотерапії.

Популяція лімфоцитів має низький процентний вміст регуляторних Т-клітин. Регуляторні Т-клітини, як відомо, пригнічують терапевтичну функцію популяції лімфоцитів. Згідно з одним варіантом втілення четвертого аспекту, процентна частка T_{reg} в популяції лімфоцитів, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає менше 5 %, краще, менше 3 %.

Крім того, більшість T_H -клітин в популяції лімфоцитів має фенотип T_{H1} . Згідно з одним варіантом втілення винаходу, процентна частка T_{H1} клітин, обчислена від загальної кількості T_H клітин, складає принаймні 10 %, краще, принаймні 50 %, ще краще, принаймні 70 %.

В популяції лімфоцитів, процентна частка цитотоксичних CD8+Т-клітин є підвищеною, про що свідчить підвищена процентна частка CXCR3+ клітин. Згідно з одним варіантом втілення винаходу, процентна частка CXCR3+ клітин, обчислена від загальної кількості CD8+Т-клітин, складає принаймні 10 %, принаймні 50 %, ще краще, принаймні 70 %.

На додаток, популяція лімфоцитів може включати підвищену кількість Т-клітин, які недавно контактували зі своїм антигеном, наприклад, ідентифікованих за фенотипом 4-1BB+. Згідно з одним варіантом втілення четвертого аспекту, процентна частка 4-1BB+Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 2 %, ще краще, принаймні 2,5 %. Згідно з одним варіантом втілення, процентна частка CD107+ клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 2 %, ще краще, принаймні 2,5 %. CD117+Т-клітини були асоційовані з популяцією довготермінової пам'яті.

Фенотип CXCR3+CD8+Т-клітин додатково асоційований з інвазивністю в тканини і, таким чином, можливо, зокрема, є корисним для імунотерапії раку. Додатково, популяція лімфоцитів може включати достатню процентну частку CD3+CD4-CD8- клітин. Ці подвійно негативні Т-клітини є високоспецифічними до антигена-мішені, оскільки вони є залежними від ко-рецептора CD4+ або CD8+ та продукують запальні цитокіни. Таким чином, вони є цитотоксичними.

Згідно з одним варіантом втілення, популяція лімфоцитів включає процентну частку CD3+CD4-CD8- клітин, обчислену від загальної кількості Т-клітин, що складає принаймні 1 %, краще, принаймні 3 %, ще краще, принаймні 5 %. Згідно з додатковим варіантом втілення, процентна частка гамма-дельта Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, в популяції лімфоцитів складає принаймні 1 %, краще, принаймні 3 %, ще краще, принаймні 5 %. Гамма-дельта Т-клітини забезпечують ефект розпізнавання піддані стресу клітини, трансформовані клітини, інфіковані клітини, наприклад, CMV+ клітини-мішені. Гамма-дельта Т-клітини перехресно розпізнають також вірусну (virally) та трансформовані клітини.

Згідно з одним варіантом втілення, популяція лімфоцитів має такі ознаки:

- процентна частка T_{reg} , обчислена від загальної кількості Т клітин, складає менше 5 %, краще, менше 3 %;

- процентна частка T_{H1} -клітин, обчислена від загальної кількості T_H -клітин, складає принаймні 50 %, краще, принаймні 70 %, ще краще, принаймні 80 %,

- процентна частка CXCR3+Т-клітин, обчислена від загальної кількості CD8+Т-клітин, складає принаймні 50 %, краще, принаймні 70 %, ще краще, принаймні 80 %,

- процентна частка 4-1BB+Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 2 %, ще краще, принаймні 2,5 %,

- процентна частка CD117+Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 2 %, ще краще, принаймні 2,5 %,

- процентна частка CD3+CD4-CD8- клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 3 %, ще краще, принаймні 5 %; і

- процентна частка $\gamma\delta$ Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 3 %, ще краще, принаймні 5 %.

Згідно з одним варіантом втілення, в популяції лімфоцитів, процентна частка прекурсорів Т-клітин (CD45RA+CCR7+), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 2 %, ще краще, принаймні 3 %. Т-клітини центральної пам'яті, як вже було показано, пов'язані з успіхом терапії Т-клітинами.

Клітини центральної пам'яті продукують декілька цитокінів, корисних для терапії, забезпечують гарну відповідь пам'яті. Однак, клітини центральної пам'яті нездатні добре

інфільтровуватися в тканину. В одному варіанті втілення, процентна частка периферичних клітин пам'яті (CD45RA-CCR7-), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 2 %, краще, принаймні 5 %, ще краще, принаймні 10 %. Периферичні клітини пам'яті демонструють високе продукування цитокінів та гарно інфільтруються в тканину. Таким чином, ці клітини є, зокрема, корисними для імунотерапії раку.

Також термінально диференційовані Т-клітини (CD45RA+CCR7-) є здатними заходити в тканину. Крім того, ці клітини демонструють продукування терапевтично корисних цитокінів. Згідно з одним варіантом втілення, процентна частка ефекторних Т-клітин (CD45RA+CCR7-), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще, принаймні 3 %, ще краще, принаймні 5 %. Процентна частка прекурсорів Т-клітин (CD45RA+CCR7+), обчислена від загальної кількості Т-клітин, може становити принаймні 1 %. Краще, процентна частка складає принаймні 2 %, ще краще, принаймні 3 %. Прекурсори Т-клітин демонструють лише продукування цитокінів і майже не заходять в тканину. Однак, ці клітини можуть бути перетворені на Т-клітини з позитивним ефектом пам'яті.

Популяція лімфоцитів згідно з п'ятим аспектом може бути додатково охарактеризована внутрішньоклітинним продукуванням цитокінів після стимуляції антигеном для проведення оцінки, величина якого принаймні удвічі перевищує стандартний відхил (у досліді) без стимуляції антигеном для проведення оцінки. Крім того, стимуляція антигеном для проведення оцінки приводить до значення індукції CD107a, яке принаймні удвічі перевищує стандартний відхил (у досліді) без стимуляції антигеном для проведення оцінки.

Завдяки цим параметрам, популяція лімфоцитів та/або популяція клінічно релевантних лімфоцитів є корисними продуктами для імунотерапії для лікування раків, інфекційних хвороб та аутоімунних хвороб.

Згідно з п'ятим аспектом, винахід передбачає імунотерапію для лікування або профілактики онкологічної хвороби, інфекційної хвороби або аутоімунної хвороби у ссавця, яка включає стадії генерування популяції клінічно релевантних лімфоцитів згідно з другим аспектом винаходу, у якому зразок з організму одержують від зазначеного ссавця, та введення популяції клінічно релевантних лімфоцитів зазначеному ссавцю. Інфекційна хвороба може бути будь-якою відомою інфекційною хворобою, пов'язаною з будь-яким відомим патогеном.

Онкологічна хвороба згідно з винаходом може бути будь-яким раком, включаючи будь-який з гострого лімфоцитарного раку, гострого мієлоїдного лейкозу, альвеолярної рабдоміосаркоми, раку кісток, раку головного мозку, раку молочної залози, раку анального отвору, анального каналу або аноректального раку, раку ока, раку внутрішньопечінкових жовчних протоків, раку суглобів, раку шиї, сечового міхура або плеври, раку носу, назальної порожнини або середнього вуха, раку вульви, хронічного лімфолейкозу, хронічного мієлоїдного раку, раку, шийки матки, гліоми, лімфому Ходжкіна, раку гіпофаринксу, раку нирки, раку гортані, раку печінки, раку легені, злоякісної мезотеліоми, меланоми, множинної мієломи, раку носоглотки, неходжкінської лімфому, раку яєчників, очеревини, сальника, раку брижі, раку підшлункової залози, раку глотки, раку простати, ректального раку, раку нирки, раку шкіри, раку м'якої тканини, раку яєчка, раку щитоподібної залози, раку сечоводу, раку сечового пухира та раку травного тракту, такого як, наприклад, езофагеальний рак, рак шлунку, рак підшлункової залози, рак шлунку, рак малої кишки, шлунково-кишкова карциноїдна пухлина, рак ротової порожнини, рак ободової кишки та гепатобіліарний рак. Краще, раки є гліобластою та раком підшлункової залози.

З метою уникнення імунних ефектів проти клінічно релевантних лімфоцитів, ракові пацієнти можуть бути "кондиціоновані" перед введенням Т-клітин. Кондиціонування має три мети. Перша полягає в забезпеченні більшого простору для популяції лімфоцитів, яку вводять інфузією, друга – у видаленні небажаних ефекторів, і третя - в збільшенні продукування факторів росту, які можуть сприяти швидкій експансії та виживанню Т-клітин, тобто, продукуванню аутологічних IL-7 та IL-15.

Клінічно релевантні лімфоцити можуть бути змішані з фармацевтично прийнятним носієм для утворення фармацевтичної композиції, яка також входить до обсягу даного винаходу. В одному варіанті втілення, клінічно релевантні лімфоцити можуть бути аутологічними для суб'єкта, тобто, клінічно релевантні лімфоцити одержують від суб'єкта, що потребує лікування, і потім вводять тому ж самому суб'єкту.

Введення аутологічних клітин суб'єкту може приводити до зменшення відторгнення клітин хазяїна у порівнянні з введенням не-аутологічних клітин. Альтернативно, клітини хазяїна є алогенними клітинами, тобто, клітини одержують від першого суб'єкта та вводять другому суб'єкту, який відрізняється від першого суб'єкта, але належить до того ж виду. Наприклад, алогенні клінічно релевантні лімфоцити можуть бути одержані від донора-людини та введені реципієнту-людині, відмінному від донора.

Для практичного здійснення способів, розкритих в даному документі, ефективна кількість клінічно релевантних лімфоцитів, описаних в даному документі, або їх композицій, може бути введена суб'єкту (наприклад, раковому пацієнту-людині, пацієнту з інфекційною хворобою, пацієнту з аутоімунною хворобою), що потребує лікування, придатним шляхом, таким як, наприклад, внутрішньовенне введення. Клітини можуть бути введені шляхом ін'єкції, катетером тощо. Якщо бажано, додаткові лікарські засоби (наприклад, цитокіни) також можуть бути спільно або послідовно введені. Будь-які клітини або їх композиції можуть бути введені суб'єкту в ефективній кількості. У використовуваному в даному документі значенні, ефективна кількість стосується кількості відповідного агента (наприклад, клітин або їх композицій), яка при введенні створює бажаний терапевтичний ефект у суб'єкта. Визначення того, чи досягне кількість клітин або композицій, описаних в даному документі, бажаного терапевтичного ефекту, буде зрозумілим кваліфікованому фахівцю. Наприклад, див. посилання 2-5. Ефективні кількості змінюються, як зрозуміло кваліфікованим фахівцям, в залежності від конкретного стану, лікування якого проводиться, тяжкості стану, індивідуальних параметрів пацієнта, включаючи вік, фізичний стан, розміру, статі та ваги, тривалості лікування, характеру супутньої терапії (якщо вона проводиться), конкретного шляху введення та інших факторів, відомих та доступних медичному працівнику. В деяких варіантах втілення, ефективна кількість полегшує, ослаблює, поліпшує, покращує, зменшує симптоми, або уповільнює прогресування бажаної хвороби або розладу у суб'єкта.

"Введення" стосується фізичного введення суб'єкту композиції, що містить клітини або фармацевтичну композицію, описані в даному документі, з використанням будь-яких з різноманітних методів та систем доставки, відомих кваліфікованим фахівцям.

Введення популяції пухлина-реактивних лімфоцитів, краще, є введенням пацієнту або локально поблизу до пухлини або в пухлину. Альтернативно, популяцію пухлина-реактивних лімфоцитів вводять в кровотік. Інші клінічно релевантні лімфоцити, краще, вводять в кровотік.

Згідно з варіантом втілення даного винаходу, суб'єкту вводять дозу клінічно релевантних лімфоцитів, яка містить принаймні приблизно 4×10^6 , $4,5 \times 10^6$, 5×10^6 , $5,5 \times 10^6$, 6×10^6 , $6,5 \times 10^6$, 7×10^6 , $7,5 \times 10^6$, 8×10^6 , $8,5 \times 10^6$, 9×10^6 , $9,5 \times 10^6$, 10×10^6 , $12,5 \times 10^6$, 15×10^6 , 20×10^6 , 25×10^6 , 30×10^6 , 35×10^6 , 40×10^6 , 45×10^6 , 50×10^6 , 60×10^6 , 70×10^6 , 80×10^6 , 90×10^6 клітин на кілограм ваги тіла. {будь ласка, поширте на інші діапазони значень, якщо треба}

Імунотерапія згідно з п'ятим аспектом популяції клінічно релевантних лімфоцитів

- спричинює регресію ракових клітин у ссавця;
- перешкоджає переходу від передпухлинного до злоякісного ураження;
- спричинює швидке старіння пухлинних клітин або передпухлинних клітин;
- викликає усунення аутоантиген-позитивних клітин;
- спричинює загибель, зупинку росту або локалізацію патогенів;
- чинить шкідливий вплив на ракові стовбурові клітини; та/або
- індукує зупинку росту ракових клітин або клітин, що експресують аутоантигени.

Згідно з шостим аспектом, винахід передбачає композицію згідно з першим аспектом винаходу, призначену для використання в консервативному лікуванні, зокрема, для лікування та профілактики інфекційної хвороби, аутоімунної хвороби або онкологічної хвороби.

Згідно з одним варіантом втілення шостого аспекту, використання включає генерування популяції клінічно релевантних лімфоцитів з використанням способу згідно з другим аспектом винаходу.

Відповідно до одного варіанта втілення композиції згідно з шостим аспектом, використання включає імунотерапію згідно з п'ятим аспектом винаходу. Як було описано вище, конкретні цитокіни цитокинового коктейля не обов'язково мають використовуватися одночасно, і можуть бути додані в різні моменти часу.

Згідно із сьомим аспектом, винахід передбачає набір для використання в консервативному лікуванні, зокрема, для лікування або профілактики інфекційної хвороби, аутоімунної хвороби або онкологічної хвороби, де набір включає IL-2, IL-15 та IL-21. Набір, додатково, необов'язково включає принаймні один з компонентів, що стимулюють TCR, зокрема, ОКТ3, коstimулюючі молекули, живильні клітини та пептид, що містить амінокислотну послідовність клінічно релевантного антигена. Краще, набір включає усі згадані компоненти.

Винахід додатково характеризується наступними прикладами.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1 - Протокол експансії лімфоцитів з використанням моноклеарних клітин периферичної крові

А) Матеріали та обладнання

і) Обладнання

- 24-лунковий планшет, (Becton, Dickinson (BD), REF 353504)
 Стерильний скальпель
 Стерильний пінцет
 Medimachine (машина для гомогенізації тканин), (BD, Cat:340588)
 5 Medicon, 50 мкм, (BD, Cat:340591)
 Filcons, 200 мкм (BD, Cat:340613)
 Витяжка з ламінарним потоком повітря (витяжка класу 2 біобезпеки)
 Низькотемпературний морозильник, -80°C
 Холодильник
 10 Центрифуга
 ii) Витратні матеріали
 Рукавички (латексні)
 Лабораторний халат
 Стерильні центрифужні пробірки, 15 мл.
 15 Наконечники для піпеток
 Груша для піпеток (Pipette aid)
 Контейнер для відходів
 iii) Реагенти
 RPMI 1640, (Gibco, REF 61870-044)
 20 Cellgro, (CellGenix, Cat:20801-0100)
 Змішана людська АВ сироватка (Innoative Research, IPLA-SerAB-13458).
 Сироватка плоду корови (Gibco, REF: 26140-079).
 Антитіло проти CD3 (ОКТ3), (Biolegend, Cat:317304).
 Людський IL-2 (Prospec, Cat: CYT-209-b).
 25 Людський IL-15 (Prospec, Cat:cyt-230-b).
 Людський IL-21 (Prospec, Cat:cyt-408-b)
 PEST (антибіотики)
 Амфотерицин
 В) Процедура
 30 Проводять аферез для здорового донора, примованого NY-ESO-1. Після розділення компонентів крові продукт, що містить лейкоцити, відокремлюють від решти. Клітини суспендують в Cellgro, що містить 5 % змішаної людської АВ сироватки, 1000 МО/мл IL-2, 10 нг/мл IL-15 та 10 нг/мл IL-21. Середовище на додаток містило 10 мкмоль пептиду NY-ESO-1 як антиген для проведення експансії. Концентрація клітин від. Експансія лімфоцитів з периферичної крові включала стадію стимуляції опромінених аутологічних МНКПК, оброблених антигеном, що представляє інтерес, в імпульсному режимі. Для цього, аутологічні МНКПК піддають імпульсній обробці протягом двох годин 10 мМ пептиду NY-ESO-1 при кімнатній температурі (RT), і потім опромінюють дозою 55 Гр. Оброблені в імпульсному режимі опромінені аутологічні МНКПК додають до культури лімфоцитів в день 7 та ресуспендують в свіжому культуральному середовищі з домішкою 5 % змішаної людської АВ сироватки з цитокінами в концентраціях, визначених вище. В день 10 клітини піддають експансії з використанням Cellgro з домішкою 5 % змішаної людської АВ сироватки та цитокінів. Антитіло ОКТ3 додають в концентрації 30 нг/мл в такому саме культуральному середовищі, як описано вище, плюс опромінені живильні клітини (55 Гр) у співвідношенні 1:10 (співвідношення фідерні клітини:Т-клітини), пептид та цитокіни. В дні 17-20 культивування клітини збирають для аналізу або перенесення пацієнту.
 35
 40
 45
 Приклад 2 - Протокол експансії лімфоцитів з використанням моноклеарних клітин периферичної крові
 Процедура Прикладу 2 є ідентичною з процедурою Прикладу 1, за винятком того, що донором був пацієнт, який отримав вакцинацію NY-ESO-1.
 50
 Приклад 3 - Протокол експансії лімфоцитів з використанням моноклеарних клітин периферичної крові
 Приклад 3 є ідентичним Прикладу 1, за винятком того, що донором є пацієнт, пухлина якого вже експресує ТАА NY-ESO-1.
 55
 Приклад 4 - Гамма-дельта Т-клітини можна збагачувати у підданих експансії лімфоцитах з цитокінами IL-2, IL-15 та IL-21
 Експансію проводять згідно з протоколом, описаним у Прикладі 1, з тією різницею, що додають до клітинної культури золедронову кислоту в концентрації 5 мкмоль. Золедронова кислота, як відомо, промотує експансію TCR гамма-дельта Т-клітин. Як показано на Фіг. 1, ця експериментальна модель приводить до сильного зростання TCR гамма-дельта Т-клітин як за

частотою, так і за абсолютними величинами. На Фіг. 1 представлені зображення протокової цитометрії підданих експансії культур в різні моменти часу. Відповідно, в перший день експансії 3,68 % клітин несуть TCR гамма-дельта. Вже на другий день спостерігається невелике зростання. Разюче, після 7 днів експансії майже 50 % Т-клітин належать до підгрупи $\gamma\delta$.

5 Приклад 5 - Експансія лімфоцитів із цитокіновим коктейлем індукуює подвійно негативні Т-клітини (CD3+CD4-CD8-).

Лімфоцити були одержані від пацієнта з нарколепсією. Експансія проводять, як описано у Прикладі 1, але з пептидом PRDM2 як антигеном для проведення експансії та стимулювання. Культивовані клітини тестують на фенотип Т-клітин в день 1 та день 18. Фіг. 2 зображує
10 результати протокової цитометрії для цих зразків. В результатах, спочатку фільтрують лімфоцити і потім фільтрують CD3+ лімфоцити. Ці клітини потім додатково аналізують на присутність CD4 та CD8. На панелях можна побачити, що після дня 1 тільки 13 % клітин мають подвійно негативний стан. Більшість клітин є CD4+. Після 18 днів експансії із цитокіновим коктейлем 92 % клітини є подвійно негативними (CD3+CD4-CD8-) Т-клітинами.

15 Крім того, тестували індукцію продукування IFN- γ підданими експансії лімфоцитами при стимуляції пептидом PRDM2. Як показано на Фіг. 3, в день 1 тільки 0,89 % клітин продукують IFN- γ при стимуляції PRDM2. На відміну від цього, зразок з дня 18 демонструє значно збільшену популяцію цитокінів, що продукують PRDM2-специфічні Т-клітини. Оскільки більшість Т-клітин є CD3+CD4-CD8-, це свідчить про те, що протокол експансії приводить до утворення клінічно
20 релевантних подвійно негативних Т-клітин.

Приклад 6 – Піддані сортуванню декстрамерні клітини продукують IFN- γ у відповідь на аутологічні EBV-LCL (клітини великоклітинної лімфоми, трансформовані вірусом Епштейна-Барр), навантажені пептидом та білком антигенів

Протокол експансії згідно з Прикладом 1 проводять з кров'ю від двох різних пацієнтів з
25 нарколепсією, також з PRDM2 як пептидом для проведення експансії. В двох різних моделях для різних пацієнтів, додавали пептиди DNaseB або PRDM2 до цитокінового коктейля в культуральному середовищі. CD3+CD4-CD8-, і звичайні CD8+Т-клітини, які були рестриковані по антигенам головного комплексу гістосумісності (MHC restricted) та націлені на PRDM2 або DNaseB, сортували методом протокової цитометрії та тестували на розпізнавання ними
30 процесованих та презентованих в природних умовах епітопів. Т-клітини від тих самих пацієнтів обробляли в імпульсному режимі пептидами або рекомбінантними білками та вимірювали продукування IFN- γ . Результати експерименту зібрані у Таблиці 1:

Таблиця 1

		Сортовані декстрамери- % частоти	DNaseB		PRDM2	DNaseB	PRDM2	Т клітини+ Аутологічні В-клітини
	Стимул		WT	MUT	WT	Білок		
Пациєнт 1	DNaseB	PRMD2 CD3+DN- 0,27 %	10,7	1,2	6,6	1,0	23,0	0,05
		DNaseB CD3+DN- 0,29 %	0,7	7,7	1,5	3,1	3,1	0,07
	PRDM2	PRMD2 CD3+DN- 0,25 %	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,10
		DNaseB CD3+DN- 0,45 %	5,3	0,6	0,4	1,8	2,7	0,0
Пациєнт 2	DNaseB	PRMD2 CD8+- 0,70 %	0,4	0,2	0,4	2,3	1,6	0,01
		DNaseB CD8+- 0,26 %	1,1	0,9	0,4	2,5	1,1	0,04
	PRDM2	PRMD2 CD8+- 0,28 %	0,9	25,8	10,7	1,3	6,5	0,0
		DNaseB CD8+- 0,32 %	22,6	7,0	14,8	11,0	7,9	0,0

Вимірюваними значеннями є концентрація IFN- γ в пг/мл. Цей експеримент показує, що цитокіновий коктейль IL-2, IL-15 та IL-21 в комбінації зі специфічним антигеном є здатним забезпечувати експансію клінічно релевантних Т-клітин, зокрема, Т-клітин, специфічних до антигенів в периферичній крові. Т-клітини можуть, краще, належать до популяції так званих DN (подвійно негативних) CD3+CD4-CD8-Т-клітин, і ці Т-клітини є функціонально високоактивними, вони продукують IFN- γ та розпізнають біологічно та медично релевантні мішені.

Приклад 7 – Аналіз лімфоцитів, підданих експансії із цитокіновим коктейлем та пухлина-асоційованими антигенами

Процедуру експансії проводять, як описано у Прикладі 1 за винятком того, що використовують INO80E та UCHL3 замість NY-ESO-1 як антиген для проведення експансії. Після 18 днів експансії, клітини стимулюють INO80E або UCHL3, (та) аналізують методом протокової цитометрії. Результати протокової цитометрії представлені на Фіг. 4 та 5. Фіг. 4А зображує сигнал клітин, розділених з використанням бічного та прямого розсіювання. Лімфоцити гейтують, як показано чорною еліптичною окружністю. Профільтровані лімфоцити потім знов фільтрують на присутність CD3. CD3⁺ клітини додатково аналізують шляхом розділення в залежності від присутності або неприсутності CD8 та CD4. В цьому експерименті, 41 % клітин були CD8⁺, 29,6 % CD4⁺, і 26,5 % - подвійно негативними. Подвійно негативні та CD8⁺ потім тестували на продукування IFN- γ при стимуляції антигенами-мішенями INO80E та UCHL3. Відзначимо, що Т-клітини об'єктивно виміряють з використанням комплексів (молекула) МНС класу 1/пептид. Згідно з результатами, зображеними на Фіг. 5А, 1,4 % CD8⁺ клітин продукують IFN- γ при стимуляції INO80E, але також 0,56 % подвійно негативних Т-клітин продукують IFN- γ при стимуляції (див. Фіг. 5В). Аналогічні результати одержані для активації UCHL3, як показано на Фіг. 5. 0,34 % CD8⁺ клітин продукують IFN- γ . Також 0,45 % подвійно негативних клітин продукують IFN- γ (див. Фіг. 5D).

Клітини, стимульовані INO80E, додатково аналізують на продукування цитокінів. Фіг. 6А-6С також зображують гейтування CD8⁺Т-клітин, що продукують IFN- γ . Аналіз клітин, що продукують CD107a, CD127 (IL-7R) та CD117, зображений на Фіг. 6D-6F. Сірі сигнали відповідають популяції CD3+CD8⁺Т-клітин в цілому (незалежно від антигенної специфічності), чорні сигнали - CD3+CD8⁺Т-клітинам, які є антигенспецифічними. Аналіз показує, що ТАА-реактивні CD8⁺Т-клітини експресують CD107a, що є маркером, асоційованим з цитотоксичністю та CD127 (рецептор IL-7R, що медіює сигнали виживання), але не з CD117, який є маркером Т-клітин з властивостями, подібними до стовбурових клітин.

Приклад 8 - Експансія МНКПК із цитокиновим коктейлем та пептидом CMVpp65

МНКПК були одержані від пацієнта з гліобластомою. та піддані експансії із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з Прикладом 1, але в комбінації з пептидом CMVpp65. Цей експеримент показує, що стимуляція пептидом CMVpp65 у комбінації із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 приводить до сильної експансії високоафінних антигенспецифічних Т-клітин (аналіз тетрамерів). Результати представлені на Фіг. 7A-7D. APC-CMV або (bzw.) PE-CMV та (und) FITC-CMV позначають i) молекули, ідентичні МНС класу I-HLA-0201, ii) ідентичні пептиди. Але молекула головного комплексу гістосумісності (МНС) є мутованою. Єдиною відмінністю є мутація в молекулі МНС - яка детектує Т-клітини з різними афінностями. Тетрамери CMV мають різні мутації. APC-CMV (середня афінність, мутація в положенні 245; (займає положення) між PE-CMV (висока афінність) та FITC-CMV (дикого типу, порівняно низька афінність). Дані показують, що мутантні тетрамери, які забезпечують утворення тільки високоафінних Т-клітинних рецепторів для зв'язування, детектують високоафінні Т-клітини (а також Т-клітини з низькою та проміжною афінністю). Високоафінні Т-клітини, як вважають, медіюють сильніші функції імунних ефektorів та краще виділяють пухлинні клітини та/або патогени.

Приклад 9 - Аналіз частоти пухлинореактивних Т-клітин після експансії лімфоцитів з периферичної крові із цитокиновим коктейлем та NY-ESO-1

МНКПК були одержані від пацієнта з раком підшлункової залози. Експеримент проводять, як описано у Прикладі 1. Фіг. 8 зображує аналіз методом протокової цитометрії зразків експансії в день 0 та день 18. Хоча в день 1 продукування IFN- γ після стимуляції NY-ESO-1 становить лише 1,85, ця концентрація різко зростає до 9,25 в день 18 (див. Фіг. 8B та 8D). Таким чином, число NY-ESO-1 специфічних Т-клітин різко збільшується під час експансії.

Приклад 10 - Експансія сурвівін-реактивних Т-клітин з периферичної крові від пацієнтів з раком

МНКПК були одержані від пацієнта з гліобластомою та піддані експансії із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з Прикладом 1, але разом з відомим ТАА сурвівіном. Знов, клітини аналізували в день 1 та після 18 днів культивування методом протокової цитометрії. Перед аналізом, піддані експансії клітини стимулюють сурвівіном. Клітини групують на CD4⁺, CD8⁺ та подвійно негативні Т-клітини. В цих групах визначають концентрацію IL-2, IFN- γ та TNF- α . Фіг. 9A зображує результати для клітин CD4⁺, Фіг. 9B - результати для подвійно негативних, і Фіг. 9C - результати для клітин CD8⁺. Результати можуть бути узагальнені таким чином: не спостерігається детектованих Т-клітинних відповідей, обумовлених продукуванням цитокинів, в момент часу 0 (T0). На відміну від цього, після 18 днів експансії було виявлено сильне продукування цитокинів у відповідь на стимуляцію сурвівіном, що свідчить про присутність сурвівін-специфічних Т-клітин. У зв'язку з цим слід зазначити, що звичайно дуже важко індукувати Т-клітинні відповіді проти сурвівіну.

Приклад 11 - Аналіз фенотипу підданих експансії лімфоцитів

МНКПК були одержані від пацієнта з гліобластомою. Експансію проводять, як описано у Прикладі 1. Зразки з дня 0 та дня 18 аналізували в залежності від присутності CD45RA та CCR7 методом протокової цитометрії. Результати зображені на Фіг. 10A та Фіг. 10B. Для цього експерименту, клітини були розділені на такі групи. Позитивні сигнали CD45RA та CCR7 у верхній правій секції графіка позначають прекурсорні клітини. CCR7+CD45RA- внизу справа є клітинами центральної пам'яті. Позитивний сигнал CD45RA з CCR7- зверху зліва - ефektorні клітини, і негативний сигнал в обох ділянках внизу зліва - периферичні клітини пам'яті. Як показує порівняння Фіг. 10A та Фіг. 10B, видно, що число клітин центральної пам'яті при експансії з цитокиновим коктейлем сильно зростає, а саме, з 3,72 до 21,1. Число периферичних клітин пам'яті трохи збільшується, у той час як число ефektorних клітин сильно зменшується. Число прекурсорних клітин лише незначно знижується з 65,4 до 57,4. Відповідно, експансія з комбінацією цитокинів згідно з винаходом збагачує Т-клітини центральної пам'яті.

Приклад 12 - Аналіз диференціації різних підгруп Т-клітин при експансії із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 разом з різними ТАА

МНКПК від пацієнтів з раком підшлункової залози обробляли згідно з Прикладом 1 різними антигенами: GPI, який є зв'язаною з клітинною поверхнею частиною мезотеліну, сурвівіном та NY-ESO-1. Результати узагальнені в Таблиці 2 нижче:

Таблиця 2

			Центральної пам'яті GD45RA- CCR7+		Прекурсорні CD45RA+CCR7+		Ефекторні Т- клітини CD45RA+CCR7-		Периферичної пам'яті GD45RA-CCR7-	
	Популяція Т-клітин, n	Антиген для стимуляції	Момент часу 0	Після стиму- ляції	Момент часу 0	Після стиму- ляції	Момент часу 0	Після стиму- ляції	Момент часу 0	Після стиму- ляції
Пацієнт Х	CD4+	GPI	12,80	24,30	44,50	24,20	7,93	2,85	34,80	48,70
		NY-ESO-1		29,10		12,20		3,71		54,90
		Сурвівін		15,50		4,24		1,89		78,40
	CD8+	GPI	0,61	4,80	26,70	50,90	57,60	25,50	15,10	16,80
		NY-ESO-1		10,90		11,30		11,50		66,30
		Сурвівін		7,20		6,96		14,50		69,30
	CD4-CD8-	GPI	1,81	4,31	29,20	19,90	58,80	40,40	10,20	35,40
		NY-ESO-1		6,90		7,44		68,80		18,90
		Сурвівін		5,49		7,10		57,80		29,80

В першій колонці вказана підгрупа аналізованих Т-клітин: CD4+, CD8+, CD4- та CD8-. В другій колонці вказаний антигенний стимул. В наступних колонках наведені процентні частки клітин центральної пам'яті, прекурсорних клітин, диференційованих ефекторних клітин та клітин периферичної пам'яті в день 0 та день 18 різних експериментів. Відповідно, деякі антигени, такі як мезотелін, особливо стимулюють експансію прекурсорних клітин, що характеризуються CD45RA+CCR7+, та клітин центральної пам'яті, що характеризуються CD45RA-CCR7-.

Приклад 13 - Збагачення прекурсорних Т-клітин та експресія з c-kit

МНКПК від пацієнта з гліобластомою піддають експансії згідно з протоколом Прикладу 1 з пептидами антигенів (EGRV, NY-ESO-1 або сурвівін). Клітини стимулюють цими самими пептидами, аналізують методом протокової цитометрії, і результати зібрані у Таблиці 3:

Таблиця 3

	Пацієнт 1				Пацієнт 2				Пацієнт 3			
	EGFRV	NY- ESO-1	Сур- ві- він	Мо- мент часу 0	EGFR V	NY- ESO-1	Сур- ві- він	Мо- мент часу 0	EGFRV	NY- ESO-1	Сур- ві- він	Мо- мент часу 0
Лімфоцити	71,2	80,3	72,7	83,2	74	48,8	51,9	68,2	71,4	67,1	62,8	85,1
CD3+	76	54,6	75,9	46,4	65,4	80,8	60,9	48,9	57,7	63,8	66,5	53,9
CD4+	11	27,4	11,1	42,5	35	63,4	61,2	47,8	9,05	24,9	23,6	35,8
c-kit+	22,4	55,2	21,9	0,6	33,5	75,8	71,3	2,17	6,44	27,6	30,3	0,29
CD107a+	5,62	17,5	5,32	0,98	2,68	14,8	13	1,47	2,56	8,5	12,2	0,69
Q1: CCR7-, CD45RA+	5,58	10,5	5,8	23	81	56,5	53,3	52,8	1,49	7,67	6,67	4,46
Q2: CCR7-, CD45RA+	59,1	13	56,5	44,2	13	35,9	40,1	32,8	59,6	36,7	43,1	41,3
Q3: CCR7+, CD45RA-	15,9	27,6	16,8	11,3	1,01	3,18	3,22	7,4	20,7	20,5	21,1	14,7
Q4: CCR7-, CD45RA-	19,4	48,9	20,9	21,5	5	4,48	3,44	7,02	18,2	35,1	29,2	39,5
CD8+	33,5	28,5	33,7	20,9	27,8	11,3	8,82	13,3	24,3	30	34,8	36
c-kit+	40,6	33,4	40,7	0,66	23	90,8	91,9	1,08	11,4	49,3	32,7	0,078
CD8aa	29,9	48,3	33,7	49	42,1	40	50,2	40,4	23,9	16	5,61	32,7
CD8ab	66,5	48,4	62,3	47	53,9	46,6	45,7	55,9	73,8	82,2	93,5	64,4

CD107a+	1,32	5,12	1,18	1,15	0,77	15	15,1	4	2,12	4,55	5,6	2,44
Q1: CCR7-, CD45RA+	15,8	42,2	14,1	51,6	92,4	75,8	69,7	68,9	14,5	15	30,2	37,1
Q2: CCR7-, CD45RA+	9,11	9,98	7,66	25,3	3,8	15,1	24,4	24,6	23,9	41,1	59,1	57,3
Q3: CCR7+, CD45RA-	5,02	3,51	5,8	2,47	0,11	0,84	1,19	2,34	2,34	6,41	2,53	1,96
Q4: CCR7-, CD45RA-	70,1	44,3	72,5	20,6	3,73	8,26	4,76	4,13	59,2	37,5	17,1	23,6
DN	54,7	38	54,6	36,2	36,3	15,2	22,4	38,6	66,4	37,2	31,5	27,9
c-kit+	11,1	9,35	11,4	2,1	5,88	21,9	46,9	1,72	5,05	15,4	5,05	0,23
CD107a+	5,36	14,2	4,39	2,5	3,12	19	13,7	3,93	3 37	15,5	17,6	3,76
Q1: CCR7-, CD45RA+	22,2	39,6	20,6	46,4	88,8	54,8	67	54,5	30,4	20,6	13,3	51,3
Q2: CCR7-, CD45RA+	3,9	12,4	3,34	32,1	4,43	21,8	19,8	37,4	1,77	19,9	36,7	10,6
Q3: CCR7+, CD45RA-	4,02	7,93	4,05	5,41	0,76	8,17	3,13	4,11	1,52	10,5	15,3	3,13
Q4: CCR7-, CD45RA-	69,9	40,1	72	16,2	5,99	15,2	10,1	4,02	66,3	49	34,7	35

Числа показують процентний склад популяцій Т-клітин в батьківському CD4+, CD8+, або подвійно негативному фенотипі для кожного з відповідних антигенів в момент часу 18 днів з порівнянням з моментом часу 0 (початок експансії). Було детектоване збагачення підгрупи прекурсорів Т-клітин, позначених CD45RA+CCR7+, асоційоване з антигеном та сильною експресією c-kit (CD117). C-kit є маркером Т-клітин з ознаками, подібними до стовбурової клітини. CD117+Т-клітини були асоційовані із забезпеченням популяції довготермінової пам'яті. Також спостерігали сильну індукцію маркера цитотоксичності/дегрануляції CD107a у стимульованих Т-клітин.

Приклад 14 - Протокол експансії із цитокиновим коктейлем та пептидом ТАА приводить до 4-1BB та TIM-3 позитивних Т-клітин

МНКПК були одержані від пацієнтів з раком підшлункової залози та піддані експансії згідно з Прикладом 1. Знов, пептиди ТАА були одержані з GPI, NY-ESO-1 та сурвівіну. Присутність різних маркерів тестували за допомогою протокової цитометрії. Маркерами є: 4-1BB, CD25, CD127, CTLA-4, LAG3, PD1 та TIM3. Результати зібрані у Таблиці 4:

Таблиця 4

			4-1BB		CD25+		CD127+		CTLA-4		LAG3+		PD1+		TIM3+	
			T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag
Па- цієнт А	CD4 +	GPI		0,33		37,00		36,80		0,01		0,18		26,10		0,02
		NY- ESO-1	0,03	5,96	6,47	25,80	66,70	45,30	0,01	0,00	0,16	0,28	8,22	25,70	0,00	0,17
		сурвівін		2,17		32,10		37,50		0,01		0,24		25,80		0,61
	CD8 +	GPI		0,03		23,90		1,77		0,06		0,29		39,20		0,01
		NY- ESO-1	0,04	0,15	1,46	39,50	23,40	2,14	0,10	0,10	0,85	0,41	7,43	44,60	0,00	0,03
		сурвівін		0,11		37,10		2,47		0,15		0,56		39,70		0,03
	CD4 - CD8 -	GPI		0,14		28,10		1,05		0,02		0,17		23,70		0,06
		NY- ESO-1	0,04	0,89	0,89	40,70	12,90	2,06	0,07	0,04	0,32	0,17	12,0 0	11,60	0,00	0,29
		сурвівін		0,41		50,10		1,84		0,03		0,23		12,50		0,43
Па- цієнт В	CD4 +	GPI		1,47		78,30		27,30		0,20		0,35		62,70		0,43
		NY- ESO-1	0,06	1,80	4,26	56,30	54,70	19,20	0,03	0,06	0,45	0,42	17,1 0	28,90	0,00	0,25
		сурвівін		3,78		75,10		27,50		0,21		0,43		61,90		0,51
	CD8 +	GPI		1,51		55,30		7,74		0,21		3,97		47,60		0,34
		NY- ESO-1	0,05	1,52	2,15	40,40	18,00	6,07	0,10	0,13	0,82	1,16	11,8 0	30,80	0,00	0,16
		сурвівін		2,71		56,40		7,45		0,33		1,78		44,10		0,39
	CD4 - CD8 -	GPI		3,19		41,60		4,94		0,52		0,75		31,60		3,12
		NY- ESO-1	0,00	3,40	0,87	25,90	7,80	6,49	0,29	0,72	0,87	0,48	10,7 0	23,40	1,07	2,01
		сурвівін		2,50		32,10		7,01		2,50		0,44		29,50		0,00

В Таблиці 4 T0 позначає концентрацію індивідуальних підгруп, вказаних у колонці 2, до експансії (T0). Ag позначає 18 днів антигенної стимуляції та стимульовану цитокинами експансію. Значення 4-1BB та значення TIM3 вказують на "навчені" антигенами Т-клітини. Було знайдено, що, зокрема, 4-1BB+Т-клітини сильно підвищуються в деяких експериментах та клітинних підгрупах. Наприклад, стимуляція NY-ESO-1 в підгрупі CD4+ приводить до 200-кратного збільшення 4-1BB+Т-клітин (з 0,03 до 5,96).

Приклад 15 - Детальний аналіз клітинних маркерів у лімфоцитах, підданих експансії з периферичної крові пацієнтів з гліобластомою

Експеримент проводять згідно з протоколом Прикладу 1 з EGFRVIII, NY-ESO-1 або сурвівіном, відповідно. Результати зібрані у Таблиці 5.

Таблиця 5

		Стим. антигеном	Пацієнт 1		Пацієнт 2		Пацієнт 3		Пацієнт 4		Пацієнт 5	
			T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag	T0	Ag
CD3+/CD4 +	CD4+	EGFRVIII		12,2		39		10,9		44,3		74,4
		NY-ESO-1	40, 4	30,5	70	62,5	36,2	30,6	48,8	63,1	65,6	74,8
		Сурвівін		24,8		70,5		33,5		63,7		72,2
	4-1BB+	EGFRVIII	0,1 3	1,39		1,85		0,39		0,91		1,47
		NY-ESO-1		26,5	0,16	50,2	0,032	16,9	0,28	3,47	0,083	2,78
		Сурвівін		34,2		43,4		14,6		11,9		4,02
	CD25+	EGFRVIII	2,7 6	31,8		50,6		12		84,3		86,9
		NY-ESO-1		66	6,43	85,7	4,01	29,6	10,1	60,5	4,73	97,5
		Сурвівін		56,4		88,2		30,6		76		94,2

	CD127+	EGFRVIII	77,6	77,5	69,5	34,7	88,5	84,9	35,7	16,4	42	8,08
		NY-ESO-1		60,4		49		64,3		34,3		2,08
		Сурвівін		55,8		54		71,5		35,8		6,77
	CTLA-4+	EGFRVIII	0,27	0,88	1,04	1,79	0,19	0,44	1,64	1,19	1,28	3,82
		NY-ESO-1		6,87		7,59		0,93		3,03		3,66
		Сурвівін		4,91		7,43		1,46		7,28		7,04
	LAG3+	EGFRVIII	10,7	7,71	12,5	10,1	4,05	4,68	3,66	2,73	2,21	3,06
		NY-ESO-1		20,8		26,3		10,8		4,65		2,58
		Сурвівін		20,5		17		13,9		5,98		3,79
	PD-1	EGFRVIII	7,1	21,9	37,8	34,2	14,8	9,13	3,99	29,3	4,64	84,5
		NY-ESO-1		55,8		50,2		15,1		39,4		87,2
		Сурвівін		47,1		55,4		17,2		55,8		90,5
	TIM3+	EGFRVIII	5E-03	0,066	5E-03	0,056	0	0,016	0,13	0,35	0,044	0,75
		NY-ESO-1		0,34		0,36		0,063		0,52		0,066
		Сурвівін		0,28		0,27		0,5		1,71		0,21
CD3+/CD8+	CD8+	EGFRVIII	18,2	34,7	19,6	30,8	39,6	25,3	20,1	34,9	9,55	16
		NY-ESO-1		33,9		9,63		33,2		25,5		13,2
		Сурвівін		36,2		11,1		45		22,2		15,1
	4-1BB+	EGFRVIII	1,64	0,78	1,16	0,49	0,66	0,47	0,067	0,96	0,17	1,93
		NY-ESO-1		13,3		24,8		12,5		7,57		10,6
		Сурвівін		12,4		25,2		11		16,2		11,6
	CD25+	EGFRVIII	5,58	59,3	5,98	44,1	1,59	25,8	3,47	90,1	1,4	86,9
		NY-ESO-1		43		97,6		65,2		50,9		96
		Сурвівін		45,4		94,6		44,4		65		94,4
	CD127+	EGFRVIII	68,8	32,6	62,7	30	67,4	43,6	42,5	15,6	52,6	21,6
		NY-ESO-1		47,6		57,1		49,4		37		12,1
		Сурвівін		42,9		53,1		57,1		37,1		19,6
	CTLA-4+	EGFRVIII	1,32	1,17	2,16	1,48	1,37	1,62	12	8,46	14,3	24,2
		NY-ESO-1		3,58		8,89		2,08		19,4		15,6
		Сурвівін		2,91		7,09		2,91		18,3		28
	LAG3+	EGFRVIII	79	92,3	88,3	94,5	91,9	96,1	15,9	12,6	18,9	26,2
		NY-ESO-1		94,5		93,1		98,3		25,6		14,3
		Сурвівін		95,5		94,6		98,1		26,5		24,6
	PD-1	EGFRVIII	7,53	18,2	26,3	39,5	4,63	14,4	6,04	21,4	5,34	56,5
		NY-ESO-1		28,3		44		18,2		26,4		80,4
		Сурвівін		29,4		41,9		12,8		37		82,7
	TIM3+	EGFRVIII	0	0,21	0,016	0,11	7E-03	0,15	0,12	0,69	0,13	2,93
		NY-ESO-1		0,061		0,11		0,27		1,72		1,2
		Сурвівін		0,19		0,2		1,75		4,13		3,96

Знов, лімфоцити розділяли в залежності від присутності CD4 або CD8+. Числа у таблиці стосуються процентного вміста клітин, позитивних щодо індивідуальних маркерів, зазначених в другій колонці таблиці в момент часу T0 або після 18 днів експансії (Ag). Знов, для більшості пацієнтів спостерігали сильну індукцію 4-1BB+T-клітин.

Приклад 16 - Аналіз лімфоцитів, підданих експансії, від пацієнта з раком підшлункової залози та від пацієнта з гліобластомою

МНКПК були одержані від пацієнта з раком підшлункової залози та від пацієнта з гліобластомою. Лімфоцити піддають експансії за протоколом згідно з Прикладом 1. Культуру лімфоцитів аналізують методом протокової цитометрії проти різноманітних маркерів. Результати представлені у Таблиці 6:

Таблиця 6

		Панкр.		Гліобластома (GBM)	
		T0	TH	T0	TH
CD3		64	69,9	70	88,6
CD4		59,1	31,2	64	11
	CCR6 нег.	88,9	97,4	95,9	86,6
	TH1	9,69	97,1	4,82	38,8
	TH2	0,23	0	0,64	0,2
	CCR6 поз.	10,1	2,03	3,25	12
	TH1*	22,2	92,1	9,64	68,1
	TH17	1,05	0	1,02	0,52
	CCR7-CD45RA+	14,5	13,8	2,69	2,06
	CCR7+CD45RA+	12,1	0,25	49	61,9
	CCR7+CD45RA-	10,9	0,2	21,2	23,3
	CCR7-CD45RA-	62,5	85,7	27,1	12,7
	C-KIT	0,52	0,051	0,77	3,12
	CD107a	0,4	0,14	0,8	4,39
CD8		33,5	64,5	30,3	71,2
	CXCR3+	6,67	96,8	17	85,5
	CCR7-CD45RA+	61,1	30,8	20,1	7,39
	CCR7+CD45RA+	9,91	0,87	66,8	66,2
	CCR7+CD45RA-	2,29	0,082	2,52	10,9
	CCR7-CD45RA-	26,6	68,2	10,5	15,5
	C-KIT	2,17	0,22	2,85	4,34
	CD107a	3,45	0,34	4,23	5,66
DN		6,15	3,47	4,56	13,7
	CXCR3+	8,67	87,3	24	58,3
	CCR7-CD45RA+	73,1	37,2	41,7	15,7
	CCR7+CD45RA+	5,63	0,093	20,2	7,12
	CCR7+CD45RA-	3,44	0,46	5,95	5,6
	CCR7-CD45RA-	17,8	62,3	32,1	71,6
	C-KIT	4,33	0,51	1,67	2,24
	CD107a	8,91	1,2	1,67	2,9

В першій колонці вказано, яку підгрупу лімфоцитів фільтрували. В другій колонці перелічені відповідні випробовані маркери. Якщо не вказано жодного маркера, то в цьому рядку наведена

5 процентна частка загального числа клітин з маркером фільтрації CD3+ по відношенню до загального числа клітин та CD4+, CD8+ або подвійно негативними. T0 знов позначає культуру до експансії і TH – час збирання в день 18. Числа позначають процентну частку клітин, що несуть вибрані маркери у колонці 2 або колонці 1, відповідно. Слід відзначити, що більшість CD4+ клітин після експансії є TH1 позитивними. Для раку підшлункової залози число CD4 клітин

10 зростає від 22,2 до 92,1 %. При гліобластомі результати є лише трохи менш вираженими - від 9,64 до 68,1 % CD4 клітин. Аналогічно, крім цього спостерігається сильна експресія CXCR3+ в CD8+Т-клітинах після експансії - 96,8 % в підшлунковій залозі та 85,5 % в гліобластомі. Відповідно, майже всі CD8+ клітини є CXCR3+. Крім того, був відзначений зсув від термінально диференційованих Т-клітин до підгруп прекурсорних Т-клітин або Т-клітин центральної пам'яті.

15 Фіг. 11 зображує графіки протокової цитометрії експерименту з визначення TH17, TH1, TH1* та TH2 у зразку пацієнта з раком підшлункової залози. Спочатку клітини гейтують на CCR6, і потім на CCR3 та CCR4, відповідно.

Приклад 17 - Експансія Т-клітин пам'яті, специфічні до певних антигенів за відсутності стимуляції цими антигенами

20 МНКПК від пацієнтів з раком підшлункової залози піддають експансії згідно з Прикладом 1 з пухлина-асоційованим антигеном NY-ESO-1. Одержані клітини стимулюють протягом чотирьох годин з такими пухлина-асоційованими антигенами: CMV, EBNA-3а, INO80E, мезотелін, NY-ESO-1, сурвівін та UCHL3. Методом протокової цитометрії визначають процентну частку

- цитокін-продукуючих Т-клітин. Числові значення наведені в Таблиці 7 для різних підгруп Т-клітин: CD8+, CD4+ та подвійно негативні. Проводили тестування таких цитокінів: IFN-γ, IL-2 та TNF. Цікаво, що не лише стимуляція NY-ESO-1 приводила до одержання цитокін-продукуючих Т-клітин і, отже, пухлинореактивних Т-клітин, але також стимуляція іншими антигенами, які не використовували в процесі експансії. Також стимуляція антигенами вірусних мішеней (CMV та EBNA-3а) приводила до одержання Т-клітин, що продукують цитокіни, що демонструє присутність Т-клітин, специфічних по відношенню до цих мішеней.

Таблиця 7

після експансії		ПІСЛЯ ВИДАЛЕННЯ СЕРЕДОВИЩА							
		PMA	CMV	EBNA-3a	INO80E	Мезотелін	NY-ESO-1	Сурвівін	UCHL3
CD8+	IFN+	20,03	0,97	1,56	0,00	0,10	0,14	0,07	0,13
	IL-2+	3,84	0,06	0,02	0,00	0,04	0,03	0,04	0,06
	TNF+	21,61	1,49	1,46	0,07	0,41	0,27	0,25	1,01
CD4+	IFN+	10,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	IL-2+	14,39	0,22	0,06	0,09	0,16	0,15	0,10	0,33
	TNF+	10,29	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,65
DN	IFN+	5,53	0,05	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	IL-2+	5,89	0,20	0,14	0,02	0,09	0,22	0,19	0,23
	TNF+	4,82	1,15	0,36	0,34	1,22	0,59	0,56	2,18

- Приклад 18 - Цитотоксичність після HPV L1-специфічної експансії
- В цьому прикладі периферичну кров одержують від пацієнта з тяжкою хворобою HPV (папіломавірус людини) (HPV33 та HPV56). Стимуляцію проводять пептидом L1 HPV та цитокіновим коктейлем, що містить IL-2, IL-15 та IL-21. Після 18 днів експансії, клітини стимулюють пептидом L1, та вимірюють методом протокової цитометрії. Результати представлені на Фіг. 12. Фіг. 12D-12F показують гейтування для лімфоцитів CD3+ та CD8+, відповідно. На Фіг. 12A, 12B та 12C прямокутник позначає ділянку з клітинами, що експресують цитокін CD107a, який є антиген-специфічним маркером дегрануляції/цитотоксичності. Фіг. 12A зображує результати, одержані для пептиду L1, Фіг. 12B - позитивний контроль, і Фіг. 12C – само лише середовище як негативний контроль. Відповідно, спостерігається збільшення з 0,77 до 2,23 процентної частки клітин, що продукують CD107a.
- Приклад 19-Т-клітини, піддані експансії із цитокіновим коктейлем та пухлинними антигенами, розпізнають аутологічні пухлинні клітини
- МНКПК від пацієнта з гліобластомою стимулюють пептидами NY-ESO-1 та пептидами CMVpp65. Периферичну кров від пацієнта з гліобластомою обробляють згідно з протоколом Прикладу 4, в якому в двох моделях стимулюючим пептидом були NY-ESO-1 або CMVpp65. Після 18 днів продукування цитокінів також проводять аналіз з використанням різних антигенів для стимуляції або аутологічних пухлинних клітин. Було знайдено, що антиген-специфічна експансія Т-клітин з використанням пептидів та цитокінового коктейля приводить до експансії Т-клітин, спрямованих проти стимулюючої мішені, але також і проти власних аутологічних пухлинних клітин пацієнта. Ця реактивність була відсутньою до експансії Т-клітин з NY-ESO-1 та цитокінами. Дані узагальнені у Таблиці 8. Числа позначають процентну частку Т-клітин, присутніх в популяції батьківських Т-клітин.

Таблиця 8

		PMA		NY-ESO-1		Сурвівін		CMV		Пухлина		Середовище	
GBM		T0	TH	T0	TH	T0	TH	T0	TH	T0	TH	T0	TH
CD4+	IFN- γ	16,35	45,20	0,00	0,33	0,00	0,30	0,00	0,66	0,00	0,23	0,00	0,11
	IL-2	50,58	64,15	0,00	0,15	0,00	0,05	0,00	0,08	0,05	0,21	0,02	0,05
	IL-17	0,69	2,09	0,02	0,08	0,01	0,11	0,00	0,01	0,04	0,21	0,03	0,09
	TNF- α	45,38	68,84	0,00	0,42	0,00	0,20	0,00	0,45	0,10	0,28	1,68	0,42
CD8+	IFN- γ	13,05	87,16	0,01	0,91	0,01	1,20	0,04	2,53	0,00	0,82	0,00	0,64
	IL-2	28,69	67,21	0,03	0,07	0,01	0,10	0,02	0,10	0,02	0,08	0,01	0,04
	IL-17	0,08	0,46	0,04	0,07	0,04	0,18	0,04	0,13	0,00	0,12	0,01	0,08
	TNF- α	14,28	63,99	0,00	0,36	0,00	0,45	0,00	1,13	0,00	0,15	2,02	0,41
CD4- CD8-	IFN- γ	8,11	63,77	0,00	2,89	0,00	3,20	0,25	7,73	0,07	2,38	1,89	0,00
	IL-2	56,02	41,42	0,03	0,32	0,00	0,39	0,25	0,10	0,30	0,40	0,13	0,14
	IL-17	0,22	0,11	0,16	0,02	0,00	0,12	0,15	0,04	0,32	0,15	0,06	0,04
	TNF- α	28,78	48,80	0,00	1,88	0,17	2,15	0,16	5,14	0,00	1,11	1,95	1,03

Приклад 20 - Порівняння експансії лімфоцитів з двома різними комбінаціями цитокінів та стимуляцією ТАА

- 5 Периферичну кров від пацієнтів з раком підшлункової залози одержують та обробляють згідно з протоколом Прикладу 4. В різних експериментальних моделях використовують NY-ESO-1 або сурвівін разом із цитокіновим коктейлем. На додаток, ці ж самі експерименти проводять без додавання цитокінів або з комбінацією IL-7 та IL-2. Після 18 днів експансії, клітини тестують на продукування ними IFN- γ при стимуляції NY-ESO-1 або сумішшю пептиду сурвівіну.
- 10 Результати представлені на Фіг. 13. Фіг. 13 зображує сильно підвищене продукування IFN- γ і, таким чином, концентрацію антиген-специфічних лімфоцитів після експансії з IL-2, IL15 та IL-21, у порівнянні з іншою композицією цитокіну, або без цитокінів.

Приклад 21 - Порівняння експансії лімфоцитів з двома різними комбінаціями цитокінів та стимуляцією ТАА

- 15 Експеримент згідно з Прикладом 20 повторюють з вірусними антигенами EBNA-1, EBNA-3а та CMVpp65. Результати узагальнені на Фіг. 14. Фіг. 14 зображує сильно підвищене продукування IFN- γ і, таким чином, концентрацію антиген-специфічних лімфоцитів після експансії з IL-2, IL15 та IL-21, у порівнянні з іншою композицією цитокіну, або без цитокінів.

Приклад 22 - Аналіз експансії Treg із цитокіновим коктейлем

- 20 Т-клітини, одержані з МНКПК, культивують в присутності цитокінового коктейля IL-2, IL-15 та IL-21 та Treg (регуляторних Т-клітин) (та) ідентифікують до та після експансії Т-клітин методом протокової цитометрії. Результати зображені на Фіг. 15. На Фіг. 15, зліва направо: показано гейтування Т-клітин на CD4+Т-клітинах і потім на CD25high, що позначає високу експресію рецептора IL-2 на активованих Т-клітинах. Потім клітини гейтували на IL-2R (високий CD125) клітинах та тестували на експресію рецептора IL-7 (CD127) та Foxp3 (внутрішньоклітинно).
- 25 Клітина Treg визначається як CD4+CD25high, Foxp3+ та CD127-негативна. Початкове число Treg було низьким (0,07 % в CD4+Т-клітинах), і н нижчим після експансії Т-клітин (0,01 %). Ці дані свідчать про те, що цитокіновий коктейль є кращим для експансії Т-клітин, оскільки відомо, що IL-2 стимулює сильну експансію Treg, вони також підкреслюють синергічні ефекти комбінації IL-2/IL-15/IL-21, що блокує експансію Treg, в той же час дозволяючи експансію Т-клітин, спрямованих проти пухлини.
- 30

Приклад 23 - Аналіз розподілу сімейства VB після експансії

- Т-клітини піддають експансії з використанням цитокінової суміші IL-2/IL-15/IL-21 разом з антигенами NY-ESO-1 протягом 21 дня. Аналіз методом протокової цитометрії проводять до (T0 = момент часу 0) та після експансії (TH = час збирання). Т-клітини, стимульовані цитокінами, узяті окремо, слюжать контролем. Результати зібрані у Таблиці 9. Відзначимо сильну переважну експансію сімейства VB7.2 в CD8+Т-клітинах, підданих експансії, в колбі GReX, а також сімейства VB13.2 в CD8+Т-клітинах (також підданих експансії в колбі GReX). Дані показують, що присутність антигена (NY-ESO-1) стимулює кращу експансію індивідуальних сімейств TCR VB – і показують також різноманітність відповіді, викликуваної антигеном (не лише цитокінами).
- 40 Сфокусовані, але різноманітні сімейства TCR VB дозволяють припустити різноманітні відповіді Т-клітин, спрямовані проти мішені.

Таблиця 9

		CD4+		CD8+				CD4+		CD8+	
		T0	TH	T0	TH			T0	TH	T0	TH
Vβ1	G-Rex	1,14	0,23	0,96	0,54	Vβ12	G-Rex	0,68	0,12	3,09	0,33
	Cyto		1,71				Cyto		0,43		1,00
	GE		1,18				GE		2,31		0,44
Vβ2	G-Rex	6,74	0,57	3,54	1,55	Vβ13.1	G-Rex	7,42	4,75	1,96	1,16
	Cyto		1,68				Cyto		2,65		0,93
	GE		7,35				GE		16,90		1,90
Vβ3	G-Rex	3,84	0,13	19,00	10,70	Vβ13.2	G-Rex	4,56	2,65	14,70	28,70
	Cyto		1,35				Cyto		2,10		18,50
	GE		1,15				GE		16,70		12,40
Vβ4	G-Rex	1,68	0,20	4,53	1,30	Vβ13.6	G-Rex	0,85	0,07	0,71	6,30
	Cyto		0,61				Cyto		0,79		0,76
	GE		5,89				GE		8,34		10,00
Vβ5.1	G-Rex	2,51	0,94	1,10	0,22	Vβ14	G-Rex	15,30	1,50	11,30	4,83
	Cyto		3,91				Cyto		8,17		8,45
	GE		0,98				GE		15,50		0,04
Vβ5.2	G-Rex	0,37	0,13	0,18	0,10	Vβ16	G-Rex	0,53	0,08	0,33	0,09
	Cyto		0,43				Cyto		0,20		0,05
	GE		2,06				GE		3,38		0,72
Vβ5.3	G-Rex	0,48	0,14	0,50	3,30	Vβ17	G-Rex	2,89	0,27	1,06	0,54
	Cyto		0,83				Cyto		1,15		1,33
	GE		2,58				GE		7,07		0,14
Vβ7.1	G-Rex	5,47	79,30	0,66	0,53	Vβ18	G-Rex	0,81	0,75	0,29	0,03
	Cyto		31,60				Cyto		2,05		0,12
	GE		37,20				GE		1,61		1,77
Vβ7.2	G-Rex	2,00	0,90	4,39	17,50	Vβ20	G-Rex	0,95	0,42	0,74	1,78
	Cyto		3,46				Cyto		1,37		1,33
	GE		5,84				GE		1,17		1,24
Vβ8	G-Rex	2,83	0,38	1,39	0,63	Vβ21,3	G-Rex	3,70	2,94	0,32	0,31
	Cyto		2,58				Cyto		3,07		0,66
	GE		1,64				GE		3,86		0,55
Vβ9	G-Rex	1,64	0,20	1,84	2,83	Vβ22	G-Rex	2,97	0,22	1,03	0,12
	Cyto		1,14				Cyto		1,38		0,58
	GE		3,45				GE		0,51		0,02
Vβ11	G-Rex	0,45	0,11	1,09	0,25	Vβ23	G-Rex	0,20	0,93	0,34	0,58
	Cyto		0,31				Cyto		3,06		2,17
	GE		0,13				GE		7,42		12,30

TH: Момент часу збирання, 21 день; G-Rex: колба G-Rex, стимуляція NY-ESO-1; Cyto: Один лише цитокін, без стимуляції; GE: система (ферментації) GE wave, стимуляція NY-ESO-1

5 Приклад 24 – Маркер PD1 в CD8+ клітинах

Т-лімфоцити піддають експансії з використанням IL-2/IL-15/IL-21 та суміші пептидів NY-ESO-1. Верхня панель: до, нижня панель: після експансії з цитокіном/ТАА=Т-клітини культивують в присутності IL-2/IL-15/IL-21. Проводять аналіз методом протокової цитометрії до та після стимуляції Т-клітин. Зліва направо: i) гейтування на лімфоцитах, ii) гейтування на CD3+Т-клітинах. iii) гейтування на CD4/CD8. Вверху справа: експресія PD1 на CD8+ активованих Т-клітинах (37 % Т-клітин). Т-клітини, піддані експансії з цитокіном/ТАА, виявляють знижену експресію PD1 на CD4CD8+Т-клітинах. Дані показують, що Т-клітини, піддані експансії з цитокіном/пептидом, демонструють знижену частоту PD1+Т-клітин на CD8+Т-клітинах – це свідчить про те, що ці піддані експансії Т-клітини можуть демонструвати більший час життя і, тому, вищу ефективність проти пухлинних клітин.

15 Приклад 25 – Численні антигени

Пептидний коктейль, що складається з 12 індивідуальних пептидів з білка L1 з HPV 33, разом з цитокіновим коктейлем, використовують для стимулювання Т-клітин від пацієнтів з HPV+ ураженням. В день 21, Т-клітини тестують на цитотоксичність, спрямовану проти кожного

індивідуального пептиду. В даному випадку, брали аутологічні EBV-трансформовані В-клітини та обробляли в імпульсному режимі пептидами 1-12, з подальшим стандартним аналізом Cr51. Цей аналіз вимірює здатність Т-клітин вбивати специфічні мішені. Результати представлені на Фіг. 16.

Т-клітини від донора А сильно розпізнають пептиди 11 та 12. Т-клітини від донора (d) В сильно розпізнають пептиди 7-12, із сильною реактивністю проти пептиду 11. Ці дані показують, що експансія Т-клітин з цитокиновим коктейлем IL-2/IL-15/IL-21 та пептидами приводить до i) утворення цитотоксичних Т-клітин, та ii) того, що відповідь Т-клітини є різноманітною та сфокусованою на варіанті набору індивідуальних пептидів. Це свідчить про те, що Т-клітини, стимульовані пептидом/цитокиновим коктейлем, можуть бути переважно цитотоксичними і можуть також бути націленими на декілька епітопів – що робить їх більш різноманітними в розпізнаванні пухлинних клітин, або вірусно інфікованих клітин, які демонструють на своїй поверхні різні набори пептидів.

Приклад 26 - Експресія CD117 до та після експансії МНКПК, стимульованою цитокином та NY-ESO-1.

МНКПК піддають експансії з сумішшю IL-2/IL-15/IL-21 в присутності пухлина-асоційованого антигена NY-ESO-1. Клітини аналізують методом протокової цитометрії до (Фіг. 18) та після експансії (Фіг. 19). Спочатку гейтують CD3+Т-клітини, потім CD3+Т-клітини гейтують на CD4+ та CD8+Т-клітини. CD117+ клітини потім детектують на CD8+Т-клітинах (верхня) та на CD4+Т-клітинах (нижня панель, зліва). Середня панель: експресія CD45RA/CCR7 в CD8+ та CD4+Т-клітини з високою популяцією на CD45RA+CCR7+Т-клітинах, які є прекурсорними Т-клітинами (середня панель). Справа: CD117+Т-клітини (помічені синім кольором) є присутніми в ефекторних Т-клітинах в CD8+Т-клітинах; CD117+Т-клітини можуть бути присутніми в різних популяціях Т-клітин в підгрупі CD4+Т-клітин. Дані свідчать про те, що експресія CD117(, який) є маркером подібності Т-клітин до стовбурових клітин (stem-ness), спостерігається в різних підгрупах Т-клітин. CD117+Т-клітини є кращими для забезпечення джерела довготермінової Т-клітинно пам'яті.

Спочатку гейтують CD3+Т-клітини, потім CD3+Т-клітини гейтують на CD4+ та CD8+Т-клітини. (Спостерігається) дуже сильна експресія та висока частота CD117+ клітин на CD8+Т-клітинах (верхня) та на CD4+Т-клітинах (нижня панель, зліва). Середня панель: експресія CD45RA/CCR7 в CD8+ та CD4+Т-клітини з високою популяцією на CD45RA+CCR7+Т-клітинах, які є прекурсорними Т-клітинами (середня панель). Справа: CD117+Т-клітини (помічені синім кольором) є присутніми в периферичних ефекторних Т-клітинах в CD45RA+CCR7-Т-клітинах (ефектори). CD84 Т-клітини; CD117+Т-клітини можуть бути присутніми в популяції прекурсорів Т-клітин CD45RA+CCR7+. Дані свідчать про те, що експресія CD117(, який) є маркером подібності Т-клітин до стовбурових клітин (stem-ness), спостерігається в різних підгрупах Т-клітин. CD117+Т-клітини є кращими для забезпечення джерела довготермінової Т-клітинно пам'яті. Також видно, що цитокиновий коктейль спричинює сильну експансію CD117+Т-клітини, забезпечуючи довготермінову імунну клітинну пам'ять, а також що CD117+Т-клітини є присутніми в прекурсорних Т-клітинах, забезпечуючи довготермінові імунні відповіді на пухлини.

Приклад 27 - Експансія культури TIL з гліобластоми

Цей приклад описує процедуру культивування TIL з раку підшлункової залози для функціонального тесту та імунотерапії.

Опис матеріалів, обладнання та витратних матеріалів наведений в Прикладі 1.

Пухлинну тканину, одержану від пацієнта, поміщають в стерильний контейнер. Тканину розрізають на шматочки 1-2 мм³ стерильним скальпелем. Шматочки тканини поміщають в лунки 24-лункового планшета по 1 шматочку на лунку. Середовище клітинної культури готують з використанням Cellgro з 10 % людської АВ сироватки. В це середовище додають IL-2, IL-15 та IL-21 до кінцевої концентрації 1000 мкг/мл (u/ml) для IL-2, 10 нг/мл для кожного з IL-15 та IL-21. Крім того, додають до середовища PEST та амфотерицин. 1 мл середовища додають в кожну лунку і клітинну культуру інкубують протягом 7 днів при 37 °C. Паралельно, МНКПК від здорового донора культивують в Cellgro, що містить 10 % людської АВ сироватки. Визначають концентрацію МНКПК та доводять до концентрації 10⁶/мл. МНКПК потім опромінюють протягом 18 хвилин при 55 Гр. Після опромінювання додають ОКТ3 до кінцевої концентрації 10 нг/мл. Ця культура називається живильними клітинами з ОКТ3. В день 10 культури TIL, 100 мкл культури фідерних клітин з ОКТ3 додають до кожної лунки 24-лункового планшета. Відповідно, культуру в кожній лунці (доводять) до кінцевої концентрації 10 нг/мл ОКТ3 та загальної кількості 10⁶ живильних клітин. Співвідношення TIL та живильних клітин становить приблизно 1:10.

Приклад 28 - Експансія культури TIL з раку підшлункової залози.

Пухлинну тканину, одержану від пацієнта, поміщають в стерильний контейнер. Тканину

розрізають на шматочки 1-2 мм³ стерильним скальпелем. Шматочки тканини поміщають в лунки 24-лункового планшета по 1 шматочку на лунку. Середовище клітинної культури готують з використанням Cellgro з 10 % людської АВ сироватки. Додають до цього середовища IL-2, IL-15 та IL-21 до кінцевої концентрації 1000 мкг/мл (μg/ml) для IL-2, 10 нг/мл для кожного з IL-15 та IL-21. Крім того, додають до середовища PEST та амфотерицин. Додають в кожну лунку 1 мл середовища та клітинну культуру інкубують протягом 4 днів при 37 °C. Паралельно, МНКПК від здорового донора культивують в Cellgro, що містить 10 % людської АВ сироватки. Визначають концентрацію МНКПК та доводять до концентрації 10⁶/мл. МНКПК потім опромінюють протягом 18 хвилин при 55 Гр. Після опромінювання додають ОКТ3 до кінцевої концентрації 10 нг/мл. Цю культуру називають живильними клітинами з ОКТ3. В день 10 культури TIL додають 100 мкл фідерної клітинної культури з ОКТ3 до кожної лунки 24-лункового планшета. Відповідно, культура в кожній лунці містить кінцеву концентрацію 10 нг/мл ОКТ3 та загальну кількість 10⁶ живильних клітин. Співвідношення TIL та живильних клітин становить приблизно 1:10.

Приклад 29 - Процедура генерування клітинної лінії пухлини з тканини

Пухлинну тканину підшлункової залози одержують безпосередньо після операції та поміщають в стерильний контейнер. Пухлинну тканину розрізають на шматочки 1-2 мм³ стерильним скальпелем. Кожен шматочек тканини переносять в лунку 24-лункового планшета. Додають в кожну лунку 1 мл культурального середовища RPMI 1640 з 10 % сироватки плоду корови. Середовище заміняють в день 7 та день 14, що означає, що культуральне середовище видаляють та заміняють на свіже культуральне середовище такого самого виду. Коли пухлинні клітини досягають дуже високої щільності, культуру переносять на 6-лунковий планшет.

Приклад 30 - Визначення точного моменту часу для додавання фідерних клітин

Було знайдено, що додавання живильних клітин не приводить до гарної експансії інфільтруючих пухлину лімфоцитів, якщо живильні клітини додають, коли концентрація лімфоцитів є дуже низькою. Фіг. 20 А зображує культуру лімфоцитів після одного тижня інкубації. Детектують певну кількість лімфоцитів, однак концентрація лімфоцитів є нижчою за базову лінію експансії. Фіг. 20В та Фіг. 20С показують цю ж саму культуру лімфоцитів після двох тижнів інкубації. Тепер число лімфоцитів, які можуть бути детектовані, зросло до рівня вище базової лінії експансії. Живильні клітини можуть бути додані на цій стадії. Фіг. 1D, Е та Е показують культуру через чотири дні, один тиждень та два тижня після додавання живильних клітин. На фігурах можна побачити, що число лімфоцитів різко зростає від зображення на Фіг. D до зображення на Фіг. F. На Фіг. F можна побачити, що лімфоцити збираються та атакують пухлинні клітини в культурі.

Приклад 31 - Аналіз фенотипу та експресії маркера активації/виснаження лімфоцитів, підданих експансії з TIL, одержаних з гліобластоми.

Пухлинну тканину одержують від 16 пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з тканини із цитокіновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21, згідно з протоколом Прикладу 1.

А)

Піддані експансії клітини аналізують методом протокової цитометрії на їх CD4/CD8 фенотип з використанням антитіла, спрямованого проти CD3, CD4 та CD8.

Результати зібрані у Таблиці 10.

Таблиця 10

	Вік	Стать (M7F)	Діагноз	Клітинна лінія пухлини	CD3+	CD8+	CD4+	CD4- CD8-	CD4+CD8+
GBM-A	69	М	GBM (стадія IV)	Y	75,50	11,40	85,20	2,92	0,47
GBM-B	66	М	PXA (стадія II-III)	Y	73,00	90,10	8,31	1,07	0,50
GBM-C	64	М	GBM (стадія IV)	Y	94,60	12,40	85,40	2,13	0,25
GBM-D	65	Ж	GBM (стадія IV)	Y	73,50	24,20	71,20	3,71	0,99
GBM-E	54	М	GBM (стадія IV)	Y	98,20	4,00	89,90	2,63	3,53
GBM-F	70	М	GBM (стадія IV)	Y	99,60	3,58	89,90	6,15	0,38
GBM-G	49	М	GBM (стадія IV)	Y	94,30	0,52	77,80	21,60	0,08
GBM-H	76	М	GBM (стадія IV)	Y	92,70	38,50	52,60	5,80	3,10
GBM-I	45	М	GBM (стадія IV)	Y	98,50	44,20	2,81	52,90	0,08
GBM-J	73	Ж	GBM (стадія IV)	Y	98,00	1,16	91,70	6,34	0,84
GBM-K	67	М	GBM (стадія IV)	Y	85,20	33,30	49,40	10,80	6,50
GBM-L	40	Ж	GBM (стадія III)	Y	94,20	81,30	12,20	6,02	0,46
GBM-M	79	М	GBM (стадія IV)	Y	99,90	0,02	92,50	7,39	0,10
GBM-N	50	Ж	О (стадія II)	Y	99,70	95,40	0,24	4,33	0,07
GBM-O	17	М	АЕ (стадія III)	Y	82,50	0,59	84,70	14,60	0,12
GBM-P	42	Ж	Рецидив, некроз	Y	99,40	1,37	80,70	17,80	0,10
N=16	58 (17-79)	11M/4Ж		Y 100 %					

Дані показують, що TIL можуть бути піддані експансії з кожної з індивідуальних пухлин, які переважно складаються з CD3+Т-клітин. В залежності від пацієнта, більшість Т-клітин належить до одного з CD4+, CD8+ або DN. Однак, найчастіше більшість належала до CD4+. Таблиця також показує, що цитокіновий коктейль є здатним забезпечувати експансію Т-клітин з пухлин ЦНС різних гістологій (див. колонку 4 "Діагноз").

В)

Піддані експансії клітини аналізують методом протокової цитометрії на їх специфічний фенотип - прекурсорні (CD45RA+CCR7+), центральної пам'яті (CD45RA-CCR7+), периферичної пам'яті (CD45RA-CCR7-), або диференційовані ефекторні (CD45RA+CCR7-) Т-клітини, та експресію маркерів активації/виснаження в базових фенотипах CD8+, CD4+ та подвійно негативних Т-клітин.

Антитіла, використовувані для аналізу популяцій TIL методом протокової цитометрії, вказані у Таблиці 11.

Таблиця 11

Імунофенотип (Immuno- phenocyte)	Барвник	Клон	Внутрішньоклітинне забарвлення цитокінів	Барвник	Клон
CD3	PerCp	SK7	CD3	ECD	UCHT1
CD4	krome Orange	13B8.2	CD4	PerCp Cy5.5	L200
CD8a	APC Cy7	SK1	CD8a	APC Cy7	SK1
CD8b	FiTC	2ST8.5H7	TNF-α	APC	MAb11
CD107a	Alexa Fluor 700	H4A3	IFN-γ	PE Cy7	B27
CD45RA	ECD	2H4	IL-2	PE	MQ1- 17H12
c-kit	PE Cy7	104D2			
CD127	APC	R34.34	Репертуар Vβ	Барвник	Клон

CCR7	Діамантовий фіолетовий 421	G043H7	CD3	PE Cy7	SK7
			CD4	krome Orange	13B8.2
Виснаження та активація	Барвник	Клон	CD8a	APC Cy7	SK1
CD3	Діамантовий фіолетовий 570	UCHT1	TCR Vβ		
			Набір репертуару		
CD4	Діамантовий фіолетовий 510	OKT4			
CD8a	APC Cy7	SK1	Treg	Барвник	Клон
4-1BB	FITC	4B4-1	CD3	ECD	UCHT1
CD127	APC AF700	R34.34	CD4	V450	RPA-T4
CD45RA	ECD	2H4	CD8a	APC Cy7	SK1
CCR7	Діамантовий фіолетовий 421	G043H7	CD25	PE Cy7	2A3
LAG-3	APC	поліклональні	CD127	APC	R34.34
CD25	PE Cy7	2A3	CD73	efluor 710	AD2
CTLA-4	PE Cy5	BNi3	CD39	PE	TU66
TIM3	PercP eFluor 710	F38-2E2	FoXP3	Alexa fluor 488	259D
PD-1	PE	EH12.1			

Результати узагальнені на Фіг. 22A та B. Більшість CD8+, CD4+ або DN Т-клітин належать до підгрупи центральної пам'яті Т-клітин, яка виявилася критично важливою для ефективної протиракової відповіді та довготермінової імунної пам'яті. Результати показують в середньому сильну експансію DN-Т-клітин. Ця підгрупа є високоактивованою та несе афінні Т-клітинні рецептори. Також спостерігають сильну експансію підгрупи CD45RA+CCR7+ прекурсорних Т-клітин, які забезпечують довготермінову пам'ять Т-клітинної відповіді, бажаної для довготермінового імунного нагляду.

Спостережувана експресія 4-1BB, LAG-3 або TIM-3 в Т-клітинах (див. Фіг. 3B) вказує на Т-клітини, специфічні по відношенню до антигена/пухлини. Приклад показує, що цитокіновий коктейль забезпечує експансію TIL, які належать переважно до підгрупи пам'яті (центральної пам'яті) Т-клітин, що була асоційована з корисними клінічними відповідями, і також показує, що піддані експансії TIL несуть маркери, асоційовані з антигеноспецифічністю.

Приклад 32 - Аналіз фенотипу та експресії маркера активація/виснаження лімфоцитів, підданих експансії з TIL, одержаних з раку підшлункової залози

Пухлинну тканину одержують від 17 пацієнтів з раком підшлункової залози. В Таблиці 12 наведені вік та стать пацієнтів, тип зразка та гістологія.

Таблиця 12

Цитокінові коктейль забезпечує експансію TIL з раків підшлункової залози різної гістології

Пацієнти	Вік	Стать	Зразок	Гістологія
Папс 1	72	М	Біопсія	папілярна аденокарцинома
Папс 2	66	М	Пухлина	протокова аденокарцинома
Папс 3	68	М	Пухлина	аденокарцинома дванадцятипалої кишки
Папс 4	67	М	Пухлина	протокова аденокарцинома
Папс 5	81	Ж	Пухлина	протокова аденокарцинома
Папс 6	50	М	Біопсія	протокова аденокарцинома
Папс 7	68	М	Біопсія	протокова аденокарцинома
Папс 8	74	Ж	Пухлина	протокова аденокарцинома
Папс 9	71	М	Пухлина	протокова аденокарцинома

Панс 10	60	Ж	Пухлина	аденокарцинома
Панс 11	42	Ж	Пухлина	протокова аденокарцинома
Панс 12	70	М	Пухлина	протокова аденокарцинома
Панс 13	59	Ж	Пухлина	залозисто-плоскоклітинна карцинома підшлункової залози
Панс 14	60	Ж	Пухлина	протокова аденокарцинома
Панс 15	72	М	Пухлина	протокова аденокарцинома
Панс 16	81	Ж	Пухлина	протокова аденокарцинома
Панс 17	61	М	Біопсія	протокова аденокарцинома

5 TIL піддають експансії з тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 28. Фенотип CD4/CD8 (визначають) з використанням антитіл, спрямованих проти CD3, CD4 та CD8.

А)

Піддані експансії клітини аналізують методом протокової цитометрії на їх CD4/CD8 фенотип з використанням антитіл, спрямованих проти CD3, CD4 та CD8. Результати зібрані у Таблиці 13.

Таблиця 13

Аналіз фенотипу Т-клітин у TIL раку підшлункової залози. Домінантні популяції CD8+TIL

Пацієнти	CD3+	CD4+	CD8+	CD4+CD8+	CD4-CD8-
Панс 1	99,9	4,33	89,3	2,33	4
Панс 2	99,9	56,1	29,8	2,76	11,3
Панс 3	99,8	17,2	71,4	1,21	10,1
Панс 4	99,6	50,5	32,1	2,3	15,1
Панс 5	99,5	99	0,073	0,51	0,39
Панс 6	99,7	41,1	51,3	3,09	4,47
Панс 7	99,7	6,57	89,9	2,62	0,93
Панс 8	99,7	32,8	64,9	1,09	1,24
Панс 9	94,8	2,07	97,2	0,3	0,47
Панс 10	98,6	92,2	5,75	0,6	1,47
Панс 11	99,7	2,24	96,7	0,3	0,76
Панс 12	99,2	71,8	22,9	4,12	1,17
Панс 13	91,7	70,9	24	3,01	2,06
Панс 14	99,9	0,66	95,7	0,13	3,55
Панс 15	99,1	75,9	19,5	3,09	1,47
Панс 16	99,3	34,1	54,4	8,6	2,86
Панс 17	91,8	17,3	65,1	2,92	14,6
Mean	99,6	34,1	54,4	2,33	2,06

Піддані експансії клітини аналізують методом протокової цитометрії на їх специфічний фенотип - прекурсорні (CD45RA+CCR7+), центральної пам'яті (CD45RA-CCR7+), периферичної пам'яті (CD45RA-CCR7-), або диференційовані ефекторні (CD45RA+CCR7-) Т-клітини в базових фенотипах CD8+ та CD4+. Результати узагальнені на Фіг. 23 та 24.

15 Більшість CD8+, CD4+ або DN Т-клітин належать до підгрупи центральної пам'яті Т-клітин, яка була визначена як критична для ефективної протиракової відповіді та довготермінової імунної пам'яті. Результати показують в середньому сильну експансію DN-Т-клітин (дані не наведені). Ця підгрупа є високоактивованою та несе афінні Т-клітинні рецептори. Також спостерігається сильна експансія CD45RA+CCR7+ прекурсорної підгрупи Т-клітин, які

20 забезпечують відповіді Т-клітин довготермінової пам'яті, бажані для довготермінового імунного нагляду.

Спостережувана експресія 4-1BB, LAG-3 або TIM-3 в Т-клітинах (див. Фіг. 24) вказують на специфічні по відношенню до антигена/пухлини Т-клітини. Приклад показує, що цитокиновий коктейль забезпечує експансію TIL, які належать переважно до підгрупи пам'яті (центральної пам'яті) Т-клітин, що були асоційовані з корисними клінічними відповідями, і також показує, що

25 піддані експансії TIL несуть маркери, асоційовані з антигеноспецифічністю.

Приклад 33 – Аналіз довжини TCR Т-клітин, підданих експансії з пухлинної тканини пацієнтів

з раком підшлункової залози

Пухлинну тканину одержують від 17 пацієнтів з раком підшлункової залози. TIL піддають експансії з тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 28. Довжину TCR вимірюють з використанням підходу на основі ПЛР. "Нормальним" для сімейства TCR є гаусівський розподіл по довжині Т-клітинних рецепторів. Одиночні піки дозволяють припустити моноклональність індивідуальних сімейств TCR. Дані, представлені на Фіг. 25, показують, що композиція TIL є моноклональною або поліклональною, дозволяючи припустити її сфокусованість проти аутологічних пухлинних мішеней, причому цитокиновий коктейль допомагає експансії сфокусованого репертуара TCR.

Приклад 34 - Аналіз продукування цитокинів у лімфоцитах, підданих експансії з TIL, одержаних від пацієнтів з гліобластомою

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 1. Піддані експансії лімфоцити стимулюють пептидами, одержаними з пухлина-асоційованих антигенів, а саме, EGRvIII, NY-ESO-1 або сурвівіном, і вимірюють процентну частку клітин, що продукують будь-який з цитокинів IFN γ та TNF α .

Результати зображені на Фіг. 26B. Для порівняння, максимальну стимуляцію тестують з RMA/інономіцином як позитивним контролем і фоновий сигнал визначають в присутності самого лише середовища (негативний контроль). Результати демонструють, що піддані експансії Т-клітини розпізнають ці загальнопоширені пухлинні антигени. Відповідно, цитокиновий коктейль забезпечує експансію Т-клітин з гліобластоми, які є реактивними до пухлинних антигенів, що були описані як клінічно релевантні та асоційовані з клінічними відповідями.

Приклад 35 - Аналіз продукування цитокинів у лімфоцитах, підданих експансії з TIL, одержаних від пацієнтів з раком підшлункової залози

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з раком підшлункової залози.

TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 27. Піддані експансії лімфоцити стимулюють пептидами, одержаними з пухлина-асоційованих антигенів, а саме, EGRvIII, NY-ESO-1 або сурвівіном, і вимірюють процентну частку клітин, що продукують будь-який з цитокинів IFN γ та TNF α . Результати зображені на Фіг. 27A. Фіг. 27B показує зображення аналізу методом протокової цитометрії для NY-ESO-1. Результати підтверджують, що піддані експансії Т-клітини розпізнають ці загальнопоширені пухлинні антигени. Відповідно, цитокиновий коктейль забезпечує експансію Т-клітин з пухлини підшлункової залози, які є реактивними по відношенню до пухлинних антигенів, що були описані як клінічно релевантні та асоційовані з клінічними відповідями.

Приклад 36 - Аналіз продукування цитокинів у лімфоцитах, підданих експансії з TIL, одержаних від пацієнтів з гліобластомою, (з) аутологічною стимуляцією

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 27. Піддані експансії лімфоцити стимулюють аутологічними пухлинними клітинами. Результати зображені на Фіг. 28A. Фіг. 28B показує зображення аналізу методом протокової цитометрії. Результати підтверджують, що піддані експансії Т-клітини розпізнають аутологічні пухлинні клітини. Відповідно, цитокиновий коктейль забезпечує експансію Т-клітин з гліобластоми, що є реактивними по відношенню до аутологічних пухлинних клітин, відповідно, до власних мутацій пацієнта.

Приклад 37: Зв'язок використання TCR при раку підшлункової залози з розпізнаванням аутологічних пухлинних клітин

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 27. Піддані експансії лімфоцити стимулюють аутологічними пухлинними клітинами. TIL спочатку гейтують на CD3+Т-клітини, потім на CD4+ та CD8+Т-клітини. Тестують частоту індивідуальних сімейств V β з використанням панелі антитіл до TCR VB. Ця панель TCR охоплює приблизно 75 % людського репертуара TCR, отже, існує можливість того, що не всі сімейства TCR V β охоплені в достатньому ступені. Розподіл сімейств V β TCR складає приблизно 2-6 % в кожному сімействі, за винятком TCR VB 2, які можуть досягати значень більше 10 %. Таблиця 14 зображує кращу експансію сімейства V β -2 в TIL від пацієнтів з гліобластомою.

Таблиця 14

Patient	Vb1	Vb2	Vb3	Vb4	Vb5.1	Vb5.2	Vb5.3	Vb7.1	Vb7.2	Vb8	Vb9	Vb11	Vb12	Vb13.1	Vb13.2	Vb13.6	Vb14	Vb15	Vb17	Vb18	Vb20	Vb21.3	Vb22	Vb23	Total	
GBM-A	CD4*	0.24	34.30	3.54	0.14	0.34	1.63	0.07	1.91	3.73	2.21	0.90	0.25	2.37	0.88	0.35	2.14	27.60	2.90	0.03	0.08	16.70	0.41	0.30	1.39	104.73
	CD8*	0.74	0.11	0.36	0.03	0.18	0.10	0.23	0.11	1.53	1.67	0.01	0.15	28.40	3.26	0.03	0.19	4.47	0.70	0.03	0.08	0.45	41.50	0.06	0.07	84.46
GBM-B	CD4*	2.45	17.60	2.97	0.27	1.72	0.65	1.01	0.86	1.53	6.90	0.56	0.12	4.18	2.60	3.25	1.64	3.63	3.84	1.35	0.62	10.50	2.97	0.70	0.79	72.71
	CD8*	0.74	2.52	9.29	0.04	0.76	0.33	0.82	0.38	0.86	3.25	0.53	2.17	2.34	1.12	2.02	0.15	3.87	1.97	0.28	0.10	2.92	3.71	0.00	0.53	40.70
GBM-C	CD4*	1.49	7.92	6.83	0.04	0.18	0.65	0.42	2.00	1.19	4.89	2.74	0.95	4.44	5.27	1.06	1.84	6.75	4.28	4.71	0.21	8.16	3.61	1.63	1.20	72.46
	CD8*	11.00	3.69	10.30	0.01	0.11	0.87	1.48	4.99	0.32	1.23	0.14	2.64	2.20	1.14	2.95	0.60	6.03	5.27	0.00	0.08	4.39	8.54	1.63	2.56	72.16
GBM-D	CD4*	0.19	33.30	1.33	0.05	0.14	0.23	0.03	0.07	0.35	2.34	0.28	0.43	3.67	4.47	0.88	0.56	2.00	17.70	0.11	0.39	3.67	4.18	1.33	0.10	77.80
	CD8*	0.12	1.67	1.00	0.07	0.09	2.23	0.08	1.80	6.80	1.23	1.00	0.42	0.46	2.08	0.56	0.74	3.38	4.38	1.25	0.04	2.88	6.71	35.40	0.09	74.48
GBM-E	CD4*	4.06	13.60	9.81	0.07	9.98	0.40	0.64	1.28	0.97	6.71	0.18	0.85	12.10	0.41	0.59	3.01	3.87	2.27	0.83	0.80	2.68	2.47	6.50	0.91	84.99
	CD8*	0.25	2.48	2.11	0.03	0.11	0.16	0.02	0.03	0.03	0.25	5.66	0.05	1.04	0.06	0.10	0.05	1.98	1.70	0.27	0.03	0.31	45.90	0.02	0.02	62.65
GBM-F	CD4*	0.09	0.17	9.21	0.34	0.06	0.56	0.05	0.08	0.13	1.10	0.04	0.02	0.03	0.02	0.71	0.12	48.20	0.24	0.14	0.01	0.08	3.34	0.96	0.05	65.76
	CD8*	10.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.70	0.00	5.26	0.00	0.00	0.00	0.00	3.45	0.00	0.00	27.71
GBM-G	CD4*	0.00	0.54	0.00	0.00	0.00	0.07	0.01	0.00	0.00	0.03	0.04	0.01	0.02	85.10	0.10	0.37	0.01	0.00	0.00	0.01	8.48	0.01	0.01	0.12	94.91
	CD8*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.86	0.00	0.00	0.00	3.57	0.00	0.00	0.00	42.90	0.00	2.04	0.00	0.00	0.00	51.37
GBM-H	CD4*	0.19	1.21	0.92	0.16	0.24	0.71	0.08	0.64	0.00	4.77	0.39	0.19	0.14	1.08	0.08	0.32	1.68	0.21	10.20	0.00	3.62	0.13	0.46	5.42	32.84
	CD8*	0.06	0.00	0.00	0.09	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	40.40	0.11	0.07	0.00	0.08	0.27	0.08	45.30	0.05	0.00	0.00	0.06	0.50	9.96	0.19	97.47
GBM-I	CD4*	0.01	99.60	0.00	0.08	0.00	0.04	0.00	0.01	0.09	0.01	0.00	0.07	0.06	0.00	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	100.04
	CD8*	0.00	0.00	0.00	0.00	97.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65	0.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	98.35
GBM-J	CD4*	0.02	0.06	0.00	0.00	0.01	0.32	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	1.01	98.40	0.10	0.00	100.01
	CD8*	0.58	0.25	0.81	0.11	0.39	0.43	0.09	0.21	0.97	3.02	0.02	0.29	0.53	0.09	6.41	0.16	13.70	1.59	0.06	0.34	1.10	5.06	1.01	1.39	38.62
GBM-K	CD4*	0.00	0.03	0.12	0.00	0.37	0.06	0.00	0.00	0.04	2.65	0.00	0.04	0.00	0.06	0.38	0.15	0.77	0.06	0.03	0.09	0.46	0.04	0.21	0.20	5.76
	CD8*	1.72	12.20	4.46	0.47	7.32	0.47	2.91	1.12	2.71	4.88	2.19	2.82	2.60	15.50	3.14	2.71	2.72	5.29	2.91	3.17	4.84	1.15	1.13	2.86	91.29
GBM-L	CD4*	1.78	0.90	0.38	0.08	1.67	0.61	4.48	1.51	6.92	2.35	0.72	0.68	0.34	0.62	6.70	6.54	1.80	4.17	1.94	7.08	1.32	36.40	1.09	3.82	93.91
	CD8*	0.47	1.39	19.30	0.15	0.08	0.15	0.22	0.65	0.05	3.41	1.70	0.19	1.93	11.10	19.90	1.08	1.91	0.97	0.83	0.01	0.10	0.23	0.30	0.36	66.47
GBM-M	CD4*	1.72	3.72	3.70	0.98	0.00	0.53	0.85	1.99	2.93	23.10	3.55	0.43	6.91	1.54	1.95	3.08	18.70	5.08	1.52	0.00	0.00	23.30	0.00	0.86	106.44
	CD8*	0.27	40.90	1.33	0.03	0.33	1.28	0.05	5.07	0.11	1.02	7.62	0.10	1.81	0.18	0.87	0.09	0.13	0.16	0.40	0.03	0.36	0.08	0.04	0.40	62.66
GBM-N	CD4*	0.28	0.04	0.02	0.01	0.45	0.10	0.02	90.70	0.00	0.07	0.07	0.10	0.04	0.05	0.27	0.27	0.01	0.04	0.06	0.05	0.01	0.06	0.11	0.58	93.42
	CD8*	1.37	2.38	1.34	0.01	0.16	0.27	0.06	0.05	0.95	0.28	0.31	0.13	0.51	3.15	0.18	0.15	2.48	0.23	0.06	0.12	0.12	0.20	0.22	0.83	15.57
GBM-O	CD4*	3.70	2.30	3.09	0.08	0.26	0.80	0.13	0.25	1.39	0.22	2.97	0.30	11.60	2.44	2.56	0.41	2.84	1.92	21.80	0.26	1.15	1.06	0.40	5.83	67.76

Дані у Таблиці 14 показують, що індивідуальні TCR VB, краще, зазнають експансії в TIL. Слід відзначити, що клональність може бути визначена тільки шляхом секвенування. Слід відзначити, що цитокіновий коктейль забезпечує експансію різних сімейств TCR V β у індивідуальних пацієнтів. Цей ефект спостерігається у пацієнтів з гліобластомою, а також у пацієнтів з раком підшлункової залози. Слід також відзначити, що деякі TIL складаються з одного або двох сімейств VB, демонструючи експансію високосфокусованих TCR VB, що дозволяє припустити процес антиген-стимульованої експансії T-клітин. Деякі TIL, які були визначені нами як такі, що переважно зазнають експансії, виявилися моноклональними. Таким чином, цитокіновий коктейль IL-2, IL-15 та IL-21 забезпечує експансію сфокусованої T-клітинної відповіді, спрямованої проти власних пухлинних клітин пацієнта.

Приклад 38 - Зв'язок використання TCR при раку підшлункової залози з розпізнаванням аутологічних пухлинних клітин

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з раком підшлункової залози. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокіновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 28.

Клітини забарвлюють методом протокової цитометрії з використанням CD3, CD4 та CD8 в комбінації з антитілом TCR V β . (Використовують) панель, що охоплює до 75 % повного репертуара TCR VB. Якщо певні сімейства T-клітин потрапили до 25 %, не охоплених цією панеллю, вони не захоплюються в цій панелі. Результати зібрані у Таблиці 15.

Таблиця 15

	Panc 1		Panc 2		Panc 3		Panc 4		Panc 5		Panc 6	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
V β 1	2,8	77,1	3,2	2,3	3,4	0,8	0,2	2,1	1,5	0,2	0,7	1,1
V β 2	8,0	0,6	9,8	2,6	4,8	0,2	8,5	2,0	0,0	0,0	9,6	19,9
V β 3	2,1	0,2	4,8	1,9	26,7	0,5	4,8	8,3	0,0	6,1	4,2	0,3
V β 4	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
V β 5.1	0,4	0,4	0,7	0,5	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,3	9,0	0,3
V β 5.2	0,2	0,1	1,5	0,0	1,5	0,0	0,1	0,2	0,2	0,0	0,2	13,7
V β 5.3	0,1	0,1	1,6	0,4	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,1
V β 7.1	0,2	0,3	0,7	2,1	0,9	3,4	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,1
V β 7.2	6,6	0,0	0,3	0,1	0,9	1,7	0,2	0,1	0,0	0,0	1,1	0,1

Vβ8	1,9	1,7	3,7	0,6	2,9	0,1	0,4	0,4	42,7	4,1	1,2	0,3
Vβ9	1,6	0,0	0,8	0,3	0,3	0,1	0,1	0,1	40,5	0,1	1,7	0,0
Vβ11	0,5	0,0	0,5	0,2	1,5	0,0	0,1	0,7	0,3	0,0	0,6	2,3
Vβ12	3,2	0,9	1,9	0,9	2,5	0,1	0,7	1,8	0,0	0,0	0,6	0,3
Vβ13.1	2,4	0,3	4,6	10,4	1,5	0,5	2,6	4,2	0,0	0,1	0,8	0,0
Vβ13.2	3,1	0,2	1,4	0,4	1,8	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	0,2	0,6
Vβ13.6	2,8	9,1	3,6	0,5	1,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,0
Vβ14	1,9	1,4	2,0	3,6	1,3	63,3	0,4	0,7	0,0	0,0	1,0	5,3
Vβ16	2,4	1,0	6,9	6,9	3,3	0,3	4,1	1,1	0,0	0,1	0,8	0,0
Vβ17	4,6	0,1	2,9	1,8	0,8	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0
Vβ18	2,4	0,1	0,2	0,0	0,5	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,4	0,2
Vβ20	7,0	5,9	6,6	13,8	4,6	0,1	3,7	0,1	0,0	0,4	0,7	0,2
Vβ21.3	0,4	0,5	3,8	4,3	0,4	0,1	0,1	0,1	0,0	3,2	6,2	0,1
Vβ22	11,1	0,2	3,3	1,7	2,8	0,2	6,2	1,8	0,1	0,0	15,1	2,1
Vβ23	3,7	0,3	0,4	0,1	0,8	0,8	0,9	0,5	1,6	0,5	0,1	4,6

	Panc 7		Panc 8		Panc 9		Panc 10		Panc 11	
	CD4	CD8	CD4	CD4	CD8	CD4	CD8	CD8	CD4	CD8
Vβ1	0,3	0,1	1,5	4,4	7,1	13,0	0,5	1,2	0,6	0,1
Vβ2	0,1	0,7	7,4	4,1	39,8	2,4	0,2	1,7	12,0	0,0
Vβ3	5,1	28,7	2,4	3,7	1,3	0,0	0,0	12,0	1,0	0,0
Vβ4	0,1	0,0	0,1	6,0	0,1	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0
Vβ5.1	41,1	6,2	9,3	10,8	1,1	0,6	0,7	0,0	3,6	0,1
Vβ5.2	2,4	0,2	0,3	1,3	9,4	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1
Vβ5.3	0,0	0,9	0,6	0,7	18,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0
Vβ7.1	0,1	0,2	5,1	0,5	1,5	0,0	0,0	0,3	0,6	0,0
Vβ7.2	1,0	0,4	5,3	1,6	0,1	0,0	0,0	3,8	13,9	0,0
Vβ8	5,4	0,5	2,3	2,7	1,4	0,4	0,3	2,2	0,5	0,1
Vβ9	0,2	0,1	1,0	3,4	1,2	0,5	0,2	0,1	4,8	0,0
Vβ11	4,0	1,0	0,2	0,6	0,3	0,1	0,2	0,0	1,0	0,1
Vβ12	0,0	0,0	0,1	1,6	0,5	0,0	0,0	0,1	0,4	0,0
Vβ13.1	8,1	10,0	5,6	3,7	0,1	35,5	0,1	16,5	5,0	0,0
Vβ13.2	0,3	1,1	0,3	6,2	0,7	0,2	0,0	0,0	0,5	99,2
Vβ13.6	1,7	0,1	3,2	2,0	0,3	0,6	0,0	6,9	0,4	0,0
Vβ14	3,2	2,8	0,6	3,6	0,8	0,1	0,0	1,4	0,4	0,1
Vβ16	0,1	0,3	0,1	1,0	0,2	0,0	0,2	25,4	0,5	0,0
Vβ17	1,0	32,9	1,3	7,5	0,3	0,1	12,3	0,1	12,4	0,0
Vβ18	1,0	0,2	3,6	0,5	0,2	0,1	0,2	0,0	0,4	0,0
Vβ20	0,1	0,0	1,4	2,5	0,5	0,1	0,1	0,4	0,1	0,0
Vβ21.3	2,4	0,0	0,6	2,4	0,1	0,9	0,0	0,3	0,5	0,0
Vβ22	0,2	2,6	1,4	3,4	1,0	3,6	0,1	0,6	1,9	0,7
Vβ23	0,1	0,1	0,2	4,5	0,7	0,6	0,1	6,7	0,1	0,0

	Panc 12		Panc 13		Panc 14		Panc 15		Panc 16	
	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8
Vβ1	1,4	25,8	0,1	0,3	0,9	16,2	0,6	2,8	0,3	0,4
Vβ2	7,5	4,8	1,5	0,6	5,1	0,7	29,3	1,5	48,9	1,0
Vβ3	1,7	8,8	0,0	0,0	13,3	2,0	1,1	17,9	11,7	0,2
Vβ4	2,2	0,4	4,8	0,0	0,9	0,1	8,3	1,2	0,1	0,1
Vβ5.1	3,4	0,5	4,6	0,2	2,7	0,8	4,2	1,6	15,2	0,2
Vβ5.2	0,3	1,8	0,1	0,1	0,4	0,1	2,3	0,8	1,2	0,1
Vβ5.3	0,3	1,6	0,1	0,0	0,1	0,3	4,2	0,3	0,9	0,0
Vβ7.1	1,6	2,8	0,1	0,3	0,3	6,3	0,9	1,8	0,3	2,2
Vβ7.2	0,4	0,1	0,0	0,0	0,7	4,8	0,4	0,1	0,0	0,0
Vβ8	3,6	1,8	1,1	0,5	1,7	0,8	1,9	4,1	0,5	0,3
Vβ9	6,7	1,0	2,4	0,1	9,7	2,3	2,0	2,0	1,8	0,4

Vβ11	0,8	0,3	0,2	0,2	0,3	0,2	1,4	0,7	0,4	0,2
Vβ12	0,3	1,0	0,3	0,0	1,5	5,9	0,3	0,2	0,3	0,1
Vβ13.1	9,2	0,3	0,5	0,2	4,3	19,6	0,7	0,8	2,6	1,1
Vβ13.2	2,5	1,4	0,2	0,2	4,4	0,9	1,8	23,0	0,4	0,6
Vβ13.6	1,5	0,2	0,5	0,2	0,3	1,9	0,6	0,9	0,3	0,4
Vβ14	0,7	3,5	0,1	0,3	2,9	2,5	0,9	7,2	2,1	0,6
Vβ16	0,1	0,1	0,0	0,2	0,2	0,8	0,2	0,2	0,1	0,0
Vβ17	3,3	2,3	31,1	0,9	9,9	1,4	1,3	1,9	1,5	0,5
Vβ18	0,3	0,3	0,5	0,1	0,9	3,1	3,3	3,6	0,4	3,3
Vβ20	1,4	0,2	0,0	0,0	0,7	0,3	0,5	0,6	0,0	0,8
Vβ21.3	0,5	8,0	0,5	0,0	1,2	0,5	0,4	0,4	0,2	1,6
Vβ22	5,2	2,0	26,0	65,9	3,6	0,8	0,7	2,9	6,2	6,4
Vβ23	0,2	0,4	0,3	1,0	0,5	0,7	1,8	7,4	0,3	0,3

Продуктування IFN γ вимірюють через 3 дні після експозиції TIL аутологічними пухлинними клітинами (суспензія окремих клітин). Високий рівень продуктування IFN γ спостерігається тільки після аутологічних пухлинних клітин (див. Фіг. 35) Продуктування IFN γ повністю блокується антитілом проти W6/32 (блокує CD8+TIL). Як контроль, антитіло L243, що блокує CD4+TIL, є нездатним заблокувати реактивність, реактивні Т-клітини в підданих експансії клітинах лімфоцитів є усі CD8+. Дані показують, що цитокіновий коктейль забезпечує експансію TIL, які дуже сфокусовані та специфічно розпізнають аутологічні пухлинні клітини від пацієнтів з раком підшлункової залози. Моноклональні сімейства TCR в TIL від пацієнтів з раком підшлункової залози: IL-2, IL-15 та IL-21 забезпечували експансію, переважно, індивідуальних сімейств TCR VB, так, переважна експансія сімейств Т-клітин асоційована з антигеноспецифічністю та сфокусованою протипухлинною реактивністю. Деякі з цих сімейств VB, що переважно зазнають експансії, містять моноклональні Т-клітини, що мають одноланцюговий TCR VB. Така експансія моноклональних TCR вказує на сфокусовану протиракову відповідь. Аналізи функціональної відповіді показали, що моноклональні піддані експансії TIL розпізнають аутологічні пухлинні клітини.

Приклад 39 - Аналіз цитолітичної відповіді підданих експансії TIL від пацієнтів з гліобластомою проти аутологічних пухлинних клітин

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокіновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом Прикладу 28. Аутологічні пухлинні клітини генерують згідно з протоколом, наведеним у Прикладі 29. Аутологічні пухлинні клітини мітять радіоактивністю та культивують з підданими експансії TIL протягом 4 год. Загибель пухлинних клітин приводить до вивільнення радіоактивності, яку потім вимірюють. Принципова схема способу зображена на Фіг. 21. Результати, зображені на Фіг. 31, підтверджують цитотоксичний ефект, залежний від співвідношення TIL до пухлинних клітин. Дані показують, що цитокіновий коктейль забезпечує експансію TIL, що є сильно цитотоксичними (cytotoxic) проти аутологічних пухлинних клітин.

Альтернативно, піддані експансії моноклональні Т-клітини та/або, краще, піддані експансії TIL тестують на їх цитотоксичність з використанням цього ж самого тесту. Результати зображені на Фіг. 32. Таблиця 16 показує, що ці імунні відповіді є специфічно спрямованими проти аутологічних пухлинних клітин. Дані показують, що цитокіновий коктейль забезпечує експансію TIL зі специфічною реактивністю, включаючи цитотоксичні відповіді, проти аутологічної пухлини.

В)

В паралельному експерименті, аутологічні пухлинні клітини інкубують протягом трьох днів з TIL, підданими експансії з гліобластоми із цитокіновим коктейлем IL-15, IL-21 та IL-2. Після інкубації вимірюють продуктування IFN γ (пг/мл) методом твердофазового імуоферментного аналізу (ELISA). Для визначення того, чи є CD4+ або CD8+ клітини відповідальними за пухлинні відповіді, використовують антитіла, що блокують відповіді антигену MHC класу I (W6/32), впливаючи на CD8+Т-клітини або блокують HLA-DR (відповіді MHC класу II), впливаючи на CD4+Т-клітини. Результати зібрані у Таблиці 16.

Таблиця 16

Діагноз	Мітка	Аутологічна пухлина	Аутологічна пухлина+W6/32	Аутологічна пухлина+L243
GBM (стадія IV)	GBM-A	15,40	0,00	0,00
PXA (стадія II-III)	GBM-B	251,19	109,75	0,00
GBM (стадія IV)	GBM-C	13,32	30,94	0,00
GBM (стадія IV)	GBM-D	1123,76	752,54	65,65
GBM (стадія IV)	GBM-E	424,86	114,93	23,28
GBM (стадія IV)	GBM-F	678,36	251,12	0,00
GBM (стадія IV)	GBM-G	0,00	0,00	0,00
GBM (стадія IV)	GBM-H	141,89	131,31	51,47
GBM (стадія IV)	GBM-I	971,12	356,22	176,89
GBM (стадія IV)	GBM-J	100,75	89,32	19,56
GBM (стадія IV)	GBM-K	89,47	0,00	0,00
АО (стадія III)	GBM-L	0,00	0,00	0,00
GBM (стадія IV)	GBM-M	0,00	0,00	0,00
О (стадія II)	GBM-N	0,00	0,00	0,00
АЕ (стадія III)	GBM-O	0,00	0,00	0,00
Рецидив, некроз	GBM-P	36,26	0,21	0,00

TIL, що продемонстрували відсутність продукування IFN γ , були сильно цитотоксичними, як було визначено стандартним аналізом вивільнення CR51. Дані показують, що TIL специфічно

5

продукують IFN γ проти аутологічних пухлинних клітин.

Приклад 40 – Аналіз цитолітичної відповіді підданих експансії TIL від пацієнтів з раком

підшлункової залози проти аутологічних пухлинних клітин

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з раком підшлункової залози. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом

10

Прикладу 28. Аутологічні пухлинні клітини генерують згідно з протоколом, наведеним у Прикладі

29. Аутологічні пухлинні клітини мітять радіоактивністю та культивують з підданими експансії TIL протягом 4 год. Загибель пухлинних клітин приводить до вивільнення радіоактивності, яку потім вимірюють. Принципова схема способу зображена на Фіг. 7. Для порівняння та як контроль використовують систему аутологічна (пухлина) (меланома) – TIL. Результати, зображені на Фіг.

15

33, підтверджують цитотоксичний ефект. Дані показують, що цитокиновий коктейль також

забезпечує експансію TIL від пацієнтів з раком підшлункової залози. Ці TIL є високосфокусованими – на основі використання TCR – та демонструють специфічну

реактивність, включаючи цитотоксичні відповіді, проти аутологічної пухлини.

Приклад 41 – Аналіз розподілу експресії CXCR3 CD4+ клітин

Пухлинну тканину одержують від пацієнтів з гліобластомою. TIL піддають експансії з пухлинної тканини із цитокиновим коктейлем IL-2, IL-15 та IL-21 згідно з протоколом

20

Прикладу 27. Клітини аналізують методом протокової цитометрії на експресію маркера, що визначає Т-клітинну функцію та хомінг-ефект.

Результати аналізу зібрані у Таблиці 17. Клітини Th1, а також CXCR3 становили менш ніж

25

10 % до експансії. Дані показують, що цитокиновий коктейль приводить до продукту Т-клітин, в якому CD8+ клітини складаються по суті з CXCR3+CD8+Т-клітин. Цей фенотип є здатним

проникати в пухлинну тканину. CD4+Т-клітини майже усі мають профіль Т_{H1}. Профіль Т_{H1} (продукування IFN γ та TNFальфа) приводить до поліпшеної протипухлинної відповіді. Також присутні CD3+CD4-CD8- (DN) Т-клітини, що є підгрупою Т-клітин, асоційованих із

30

сильними аутоімунною та пухлинною відповідями, яка також експресує маркер CXCR3, який забезпечує можливість кращого проникнення в пухлинну тканину.

Таблиця 17

Лімфоцити			76,3
CD3+			84,3
CD8+	CD8+		25
	c-kit		0,49
	CD107a+		1,58
	CXCR3+		81,1
DP	DP		2,55
CD4+	CD4+		68,9
	c-kit		0,073
	CCR6+	CCR6+	36,2
		TH1*	89,3
		TH17	0,047
	CCR6-	CCR6-	63,8
		TH1	91,5
		TH2	0,038
	CD107a+		1
DN	DN		3,56
	c-kit		1,36
	CD107a+		1
	CXCR3+		59,1

Приклад 42 – Розпізнавання TIL загальнопоширених пухлинних антигенів від пацієнтів з раком підшлункової залози

- 5 TAA у вигляді 15 перекривних пептидів інкубують протягом трьох днів з TIL та вимірюють продукування IFN γ (пг/мл) методом ELISA. На додаток, антигенні відповіді блокують або антитілом, що блокує антигенні відповіді МНС класу I (W6/32), що впливає на CD8+T-клітини, або блокують HLA-DR (відповіді МНС класу II, L243), що впливає на CD4+T-клітини. Продукування IFN γ (пг/мл) в кожному із зразків наведено в Таблиці 18. Продукування IFN γ в TIL, 10 що є антигеноспецифічним, як показано блокуванням Т-клітин, спрямованих проти МНС класу I (блокування CD8+Т-клітин) або проти МНС класу II (блокування CD4+). Результати підтверджують, що TIL продукують IFN γ проти загальнопоширених ракових антигенів, зокрема, NY-ESO-1 або мезотеліну від пацієнтів з раком підшлункової залози.

Таблиця 18

	NY-ESO-1	NY-ESO-1+W6/32	NY-ESO-1+L243	Сур-вівін	Сурвівін +W6/32	Сурвівін +L243	Мезо-телін	Мезо-телін +W6/32	Мезо-телін +L243
Панс 1	6,97	0	0	0	0	0	262,23	15,26	0
Панс 2	24,20	0	0	0	0	0	291,27	13,50	0
Панс 6	51,02	31,96	33,74	77,99	49,24	36,72	44,46	34,34	27,21
Панс 10	4,13	0	0	66,06	0	0	78,70	72,88	0
Панс 11	0	0	0	0	0	0	131,16	0	0
Панс 14	10,47	0	0	0	0	0	275,15	н.д.	249,95
Панс 16	173,19	0	0	8,35	0	0	19,64	0	н.д.

Багато модифікацій та інших варіантів втілення винаходу, викладених в даному документі. будуть очевидними для кваліфікованих фахівців в галузі техніки, до якої належить винахід, що

можуть користуватися наведеним вище описом та супровідними кресленнями. Таким чином, слід розуміти, що винахід не має обмежуватися конкретними розкритими варіантами втілення, і що модифікації та інші варіанти втілення мають бути включені до обсягу прикладеної формули винаходу. Хоча в даному документі застосовуються конкретні терміни, вони використовуються

лише узагальнено та описово, а не з метою обмеження.

ПОСИЛАННЯ

1. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
2. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer*. 2008;8(4):299-308.
3. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine*. 1988;319(25):1676-80.
4. Robbins PF, Lu YC, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med*. 2013;19(6):747-52.
5. Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu YC, Dudley ME, et al. Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+T cells in a patient with epithelial cancer. *Science*. 2014;344(6184):641-5.
6. Li Y, Liu S, Hernandez J, Vence L, Hwu P, Radvanyi L. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro. *Journal of immunology*. 2010;184(1):452-65.
7. June CH. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(5):1204-12.
8. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, Yu D, Yang JC, Topalian SL, et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy*. 2001;24(4):363-73.
9. Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, Even J, Rosenberg SA. Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients. *Journal of immunotherapy*. 2003;26(4):332-42.
10. Weber J, Atkins M, Hwu P, Radvanyi L, Sznol M, Yee C, et al. White paper on adoptive cell therapy for cancer with tumor-infiltrating lymphocytes: a report of the CTEP subcommittee on adoptive cell therapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(7):1664-73.
11. Tran KQ, Zhou J, Durlinger KH, Langhan MM, Shelton TE, Wunderlich JR, et al. Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy. *Journal of immunotherapy*. 2008;31(8):742-51.
12. Nguyen LT, Yen PH, Nie J, Liadis N, Ghazarian D, Al-Habeeb A, et al. Expansion and characterization of human melanoma tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). *PloS one*. 2010;5(11):e13940.
13. Zhou J, Dudley ME, Rosenberg SA, Robbins PF. Selective growth, in vitro and in vivo, of individual T cell clones from tumor-infiltrating lymphocytes obtained from patients with melanoma. *Journal of immunology*. 2004;173(12):7622-9.
14. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+T cells against NY-ESO-1. *The New England journal of medicine*. 2008;358(25):2698-703.
15. Kagamu H, Shu S. Purification of L-selectin(low) cells promotes the generation of highly potent CD4 antitumor effector T lymphocytes. *Journal of immunology*. 1998;160(7):3444-52.
16. Xie Y, Akpınarli A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon EK, et al. Naive tumorspecific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *The Journal of experimental medicine*. 2010;207(3):651-67.
17. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, Laumer M, Berger J, Andreesen R. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(31):5060-9.
18. Jager E, Gnjatich S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, et al. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+T lymphocyte and antibody responses in peptidevaccinated patients with NY-ESO-1+cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(22):12198-203.
19. Ho WY, Nguyen HN, Wolfl M, Kuball J, Greenberg PD. In vitro methods for generating CD8+T-cell clones for immunotherapy from the naive repertoire. *Journal of immunological methods*.

2006;310(1-2):40-52.

20. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002;298(5594):850-4.

5 21. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature*. 1998;394(6696):897-901.

22. Tanaka M, Suganami T, Kim-Saijo M, Toda C, Tsuiji M, Ochi K, et al. Role of central leptin signaling in the starvation-induced alteration of B-cell development. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(23):8373-80.

10 23. Ravindran R, Khan N, Nakaya HI, Li S, Loebbermann J, Maddur MS, et al. Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation. *Science*. 2014;343(6168):313-7.

24. Pearson C, Silva A, Seddon B. Exogenous amino acids are essential for interleukin-7 induced CD8 T cell growth. [corrected]. *PloS one*. 2012;7(4):e33998.

15 25. Schwartzentruber DJ, Hom SS, Dadmarz R, White DE, Yannelli JR, Steinberg SM, et al. In vitro predictors of therapeutic response in melanoma patients receiving tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1994;12(7):1475-83.

20 26. Pittet MJ, Speiser DE, Valmori D, Cerottini JC, Romero P. Cutting edge: cytolytic effector function in human circulating CD8+T cells closely correlates with CD56 surface expression. *Journal of immunology*. 2000;164(3):1148-52.

27. Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, et al. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. *Journal of immunotherapy*. 2007;30(1):123-9.

25 28. Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. *Journal of immunology*. 2005;175(10):7046-52.

29. Inozume T, Hanada K, Wang QJ, Ahmadzadeh M, Wunderlich JR, Rosenberg SA, et al. Selection of CD8+PD-1+lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T cells. *Journal of immunotherapy*. 2010;33(9):956-64.

30 30. Zeng R, Spolski R, Finkelstein SE, Oh S, Kovanen PE, Hinrichs CS, et al. Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+T cell expansion and function. *The Journal of experimental medicine*. 2005;201(1):139-48.

35 31. Liu D, Song L, Wei J, Courtney AN, Gao X, Marinova E, et al. IL-15 protects NKT cells from inhibition by tumor-associated macrophages and enhances antimetastatic activity. *The Journal of clinical investigation*. 2012;122(6):2221-33.

32. Li Y, Bleakley M, Yee C. IL-21 influences the frequency, phenotype, and affinity of the antigen-specific CD8 T cell response. *Journal of immunology*. 2005;175(4): 2261-9.

40 33. Gattinoni L, Ji Y, Restifo NP. Wnt/beta-catenin signaling in T-cell immunity and cancer immunotherapy. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(19):4695-701.

34. Gattinoni L, Zhong XS, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8+memory stem cells. *Nat Med*. 2009;15(7):808-13.

45 35. Yi JS, Du M, Zajac AJ. A vital role for interleukin-21 in the control of a chronic viral infection. *Science*. 2009;324(5934):1572-6.

36. Jager D, Karbach J, Pauligk C, Seil I, Frei C, Chen YT, et al. Humoral and cellular immune responses against the breast cancer antigen NY-BR-1: definition of two HLAA2 restricted peptide epitopes. *Cancer immunity*. 2005;5:11.

50 37. Jager E, Karbach J, Gnjjatic S, Jager D, Maeurer M, Atmaca A, et al. Identification of a naturally processed NY-ESO-1 peptide recognized by CD8+T cells in the context of HLA-B51. *Cancer immunity*. 2002;2:12.

38. Di Tomaso T, Mazzoleni S, Wang E, Soven G, Clavenna D, Franzin A, et al. Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(3):800-13.

39. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, Shimato S, Ito M, Kuzushima K, et al. The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;122(11):2542-53.

60 40. Konkankit VV, Kim W, Koya RC, Eskin A, Dam MA, Nelson S, et al. Decitabine

immunosensitizes human gliomas to NY-ESO-1 specific T lymphocyte targeting through the Fas/Fas ligand pathway. *Journal of translational medicine*. 2011;9:192.

41. Maeurer M, Hohn H, Castelli C, Salter RD, Necker A, Reichert T, et al. Antigen recognition by T cells: a strong sense of structure. *Trends in immunology*. 2001;22(11):599-601.

5 42. Maeurer MJ, Gollin SM, Martin D, Swaney W, Bryant J, Castelli C, et al. Tumor escape from immune recognition: lethal recurrent melanoma in a patient associated with downregulation of the peptide transporter protein TAP-1 and loss of expression of the immunodominant MART-1/Melan-A antigen. *The Journal of clinical investigation*. 1996;98(7):1633-41.

10 43. Maeurer MJ, Necker A, Salter RD, Castelli C, Hohn H, Karbach J, et al. Improved detection of melanoma antigen-specific T cells expressing low or high levels of CD8 by HLA-A2 tetramers presenting a Melan-A/Mart-1 peptide analogue. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2002;97(1):64-71.

15 44. Magalhaes I, Vudattu NK, Ahmed RK, Kuhlmann-Berenzon S, Ngo Y, Sizemore DR, et al. High content cellular immune profiling reveals differences between rhesus monkeys and men. *Immunology*. 2010;131(1):128-40.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> PolyBioCept AB
 <120> ЕКСПАНСІЯ ЛІМФОЦИТІВ З КОМПОЗИЦІЄЮ ЦИТОКІНУ ДЛЯ АКТИВНОЇ
 КЛІТИННОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ
 <130> 7027/P/1003-W02
 <150> DE 10 2014 211 167.6
 <151> 2014-06-11
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
 20 25 30
 Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile
 35 40 45
 Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe
 50 55 60
 Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
 85 90 95
 Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
 100 105 110
 Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
 115 120 125

```

Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130                      135                      140

Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145                      150

<210> 2
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Ile Ser Lys Pro His Leu Arg Ser Ile Ser Ile Gln Cys Tyr
1                      5                      10                      15

Leu Cys Leu Leu Leu Asn Ser His Phe Leu Thr Glu Ala Gly Ile His
20                      25                      30

Val Phe Ile Leu Gly Cys Phe Ser Ala Gly Leu Pro Lys Thr Glu Ala
35                      40                      45

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
50                      55                      60

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
65                      70                      75                      80

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
85                      90                      95

Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
100                      105                      110

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
115                      120                      125

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
130                      135                      140

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
145                      150                      155                      160

```


Thr Ser

<210> 3
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

Met Glu Arg Ile Val Ile Cys Leu Met Val Ile Phe Leu Gly Thr Leu
 1 5 10 15

Val His Lys Ser Ser Ser Gln Gly Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met
 20 25 30

Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp
 35 40 45

Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys
 50 55 60

Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala
 65 70 75 80

Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu
 85 90 95

Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg
 100 105 110

Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu
 115 120 125

Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His
 130 135 140

Leu Ser Ser Arg Thr His Gly Ser Glu Asp Ser
 145 150 155

<210> 4

<211> 180
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly
 20 25 30

Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala
 35 40 45

Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro
 50 55 60

His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala
 65 70 75 80

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe
 85 90 95

Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp
 100 105 110

Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val
 115 120 125

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln
 130 135 140

Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met
 145 150 155 160

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser
 165 170 175

Gly Gln Arg Arg
 180

<210> 5
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

Met Gly Ala Pro Thr Leu Pro Pro Ala Trp Gln Pro Phe Leu Lys Asp
1          5          10          15

His Arg Ile Ser Thr Phe Lys Asn Trp Pro Phe Leu Glu Gly Cys Ala
          20          25          30

Cys Thr Pro Glu Arg Met Ala Glu Ala Gly Phe Ile His Cys Pro Thr
          35          40          45

Glu Asn Glu Pro Asp Leu Ala Gln Cys Phe Phe Cys Phe Lys Glu Leu
          50          55          60

Glu Gly Trp Glu Pro Asp Asp Asp Pro Ile Glu Glu His Lys Lys His
65          70          75          80

Ser Ser Gly Cys Ala Phe Leu Ser Val Lys Lys Gln Phe Glu Glu Leu
          85          90          95

Thr Leu Gly Glu Phe Leu Lys Leu Asp Arg Glu Arg Ala Lys Asn Lys
          100          105          110

Ile Ala Lys Glu Thr Asn Asn Lys Lys Lys Glu Phe Glu Glu Thr Ala
          115          120          125

Lys Lys Val Arg Arg Ala Ile Glu Gln Leu Ala Ala Met Asp
          130          135          140
    
```

<210> 6
 <211> 630
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

```

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
1          5          10          15
    
```

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly
245 250 255

Gln Pro Ile Ile Arg Ser Ile Pro Gln Gly Ile Val Ala Ala Trp Arg
260 265 270

Gln Arg Ser Ser Arg Asp Pro Ser Trp Arg Gln Pro Glu Arg Thr Ile
275 280 285

Leu Arg Pro Arg Phe Arg Arg Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser
290 295 300

Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys
305 310 315 320

Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met
325 330 335

Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu
340 345 350

Lys His Lys Leu Asp Glu Leu Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val
355 360 365

Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile
370 375 380

Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu
385 390 395 400

Val Asn Lys Gly His Glu Met Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu
405 410 415

Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln
420 425 430

Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr
435 440 445

```

Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser
450                               455                               460

Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln
465                               470                               475                               480

Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn
                               485                               490                               495

Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro
                               500                               505                               510

Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu
                               515                               520                               525

Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val
                               530                               535                               540

Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala
545                               550                               555                               560

Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln
                               565                               570                               575

Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn
                               580                               585                               590

Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr
                               595                               600                               605

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu
610                               615                               620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala
625                               630

<210> 7
<211> 1210
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

```

```

Met Arg Pro Ser Gly Thr Ala Gly Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1           5           10           15

Ala Leu Cys Pro Ala Ser Arg Ala Leu Glu Glu Lys Lys Val Cys Gln
          20           25           30

Gly Thr Ser Asn Lys Leu Thr Gln Leu Gly Thr Phe Glu Asp His Phe
          35           40           45

Leu Ser Leu Gln Arg Met Phe Asn Asn Cys Glu Val Val Leu Gly Asn
50           55           60

Leu Glu Ile Thr Tyr Val Gln Arg Asn Tyr Asp Leu Ser Phe Leu Lys
65           70           75           80

Thr Ile Gln Glu Val Ala Gly Tyr Val Leu Ile Ala Leu Asn Thr Val
          85           90           95

Glu Arg Ile Pro Leu Glu Asn Leu Gln Ile Ile Arg Gly Asn Met Tyr
          100          105          110

Tyr Glu Asn Ser Tyr Ala Leu Ala Val Leu Ser Asn Tyr Asp Ala Asn
          115          120          125

Lys Thr Gly Leu Lys Glu Leu Pro Met Arg Asn Leu Gln Glu Ile Leu
          130          135          140

His Gly Ala Val Arg Phe Ser Asn Asn Pro Ala Leu Cys Asn Val Glu
145           150           155           160

Ser Ile Gln Trp Arg Asp Ile Val Ser Ser Asp Phe Leu Ser Asn Met
          165          170          175

Ser Met Asp Phe Gln Asn His Leu Gly Ser Cys Gln Lys Cys Asp Pro
          180          185          190

Ser Cys Pro Asn Gly Ser Cys Trp Gly Ala Gly Glu Glu Asn Cys Gln
          195          200          205

Lys Leu Thr Lys Ile Ile Cys Ala Gln Gln Cys Ser Gly Arg Cys Arg

```

210				215				220							
Gly 225	Lys	Ser	Pro	Ser	Asp 230	Cys	Cys	His	Asn	Gln 235	Cys	Ala	Ala	Gly 240	Cys 240
Thr	Gly	Pro	Arg	Glu 245	Ser	Asp	Cys	Leu	Val 250	Cys	Arg	Lys	Phe	Arg 255	Asp
Glu	Ala	Thr	Cys 260	Lys	Asp	Thr	Cys	Pro 265	Pro	Leu	Met	Leu	Tyr 270	Asn	Pro
Thr	Thr	Tyr 275	Gln	Met	Asp	Val	Asn 280	Pro	Glu	Gly	Lys	Tyr 285	Ser	Phe	Gly
Ala 290	Thr	Cys	Val	Lys	Lys	Cys 295	Pro	Arg	Asn	Tyr	Val 300	Val	Thr	Asp	His
Gly 305	Ser	Cys	Val	Arg	Ala 310	Cys	Gly	Ala	Asp	Ser 315	Tyr	Glu	Met	Glu 320	Glu 320
Asp	Gly	Val	Arg	Lys 325	Cys	Lys	Lys	Cys	Glu 330	Gly	Pro	Cys	Arg	Lys 335	Val
Cys	Asn	Gly	Ile 340	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe 345	Lys	Asp	Ser	Leu	Ser 350	Ile	Asn
Ala	Thr	Asn 355	Ile	Lys	His	Phe	Lys 360	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile 365	Ser	Gly	Asp
Leu	His 370	Ile	Leu	Pro	Val	Ala 375	Phe	Arg	Gly	Asp 380	Ser	Phe	Thr	His	Thr
Pro 385	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln 390	Glu	Leu	Asp	Ile 395	Leu	Lys	Thr	Val	Lys	Glu 400
Ile	Thr	Gly	Phe	Leu 405	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp 410	Pro	Glu	Asn	Arg	Thr 415	Asp
Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu 420	Ile 425	Ile	Arg	Gly	Arg	Thr 430	Lys	Gln

His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu
435 440 445

Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser
450 455 460

Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu
465 470 475 480

Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu
485 490 495

Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro
500 505 510

Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn
515 520 525

Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly
530 535 540

Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro
545 550 555 560

Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro
565 570 575

Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val
580 585 590

Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp
595 600 605

Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys
610 615 620

Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly
625 630 635 640

Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu

	645		650		655
Leu	Leu	Val	Val	Ala	Leu
				Gly	Ile
				Gly	Leu
				Phe	Met
				Arg	Arg
				Arg	His
Ile	Val	Arg	Lys	Arg	Thr
				Leu	Arg
				Arg	Leu
				Leu	Gln
				Glu	Arg
				Glu	Leu
Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro
				Ser	Gly
				Glu	Ala
				Pro	Asn
				Gln	Ala
				Leu	Leu
Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr
				Glu	Phe
				Lys	Lys
				Ile	Lys
				Val	Leu
				Gly	Ser
Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val
				Tyr	Lys
				Gly	Leu
				Trp	Ile
				Pro	Glu
				Gly	Glu
Lys	Val	Lys	Ile	Pro	Val
				Ala	Ile
				Lys	Glu
				Leu	Arg
				Glu	Ala
				Thr	Ser
Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu
				Ile	Leu
				Asp	Glu
				Ala	Tyr
				Val	Met
				Ala	Ser
Val	Asp	Asn	Pro	His	Val
				Cys	Arg
				Leu	Leu
				Gly	Ile
				Cys	Leu
				Thr	Ser
Thr	Val	Gln	Leu	Ile	Thr
				Gln	Leu
				Met	Pro
				Phe	Gly
				Cys	Leu
				Leu	Asp
Tyr	Val	Arg	Glu	His	Lys
				Asp	Asn
				Ile	Gly
				Ser	Gln
				Tyr	Leu
				Leu	Asn
Trp	Cys	Val	Gln	Ile	Ala
				Lys	Gly
				Met	Asn
				Tyr	Leu
				Glu	Asp
				Arg	Arg
Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu
				Ala	Ala
				Arg	Asn
				Val	Leu
				Val	Lys
				Thr	Pro
Gln	His	Val	Lys	Ile	Thr
				Asp	Phe
				Gly	Leu
				Ala	Lys
				Leu	Leu
				Gly	Ala

Glu Glu Lys Glu Tyr His Ala Glu Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp
 865 870 875 880
 Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu His Arg Ile Tyr Thr His Gln Ser Asp
 885 890 895
 Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu Met Thr Phe Gly Ser
 900 905 910
 Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Ser Glu Ile Ser Ser Ile Leu Glu
 915 920 925
 Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr
 930 935 940
 Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile Asp Ala Asp Ser Arg Pro Lys
 945 950 955 960
 Phe Arg Glu Leu Ile Ile Glu Phe Ser Lys Met Ala Arg Asp Pro Gln
 965 970 975
 Arg Tyr Leu Val Ile Gln Gly Asp Glu Arg Met His Leu Pro Ser Pro
 980 985 990
 Thr Asp Ser Asn Phe Tyr Arg Ala Leu Met Asp Glu Glu Asp Met Asp
 995 1000 1005
 Asp Val Val Asp Ala Asp Glu Tyr Leu Ile Pro Gln Gln Gly Phe
 1010 1015 1020
 Phe Ser Ser Pro Ser Thr Ser Arg Thr Pro Leu Leu Ser Ser Leu
 1025 1030 1035
 Ser Ala Thr Ser Asn Asn Ser Thr Val Ala Cys Ile Asp Arg Asn
 1040 1045 1050
 Gly Leu Gln Ser Cys Pro Ile Lys Glu Asp Ser Phe Leu Gln Arg
 1055 1060 1065
 Tyr Ser Ser Asp Pro Thr Gly Ala Leu Thr Glu Asp Ser Ile Asp

```

1070              1075              1080
Asp Thr  Phe Leu Pro Val Pro  Glu Tyr Ile Asn Gln  Ser Val Pro
1085              1090              1095

Lys Arg  Pro Ala Gly Ser Val  Gln Asn Pro Val Tyr  His Asn Gln
1100              1105              1110

Pro Leu  Asn Pro Ala Pro Ser  Arg Asp Pro His Tyr  Gln Asp Pro
1115              1120              1125

His Ser  Thr Ala Val Gly Asn  Pro Glu Tyr Leu Asn  Thr Val Gln
1130              1135              1140

Pro Thr  Cys Val Asn Ser Thr  Phe Asp Ser Pro Ala  His Trp Ala
1145              1150              1155

Gln Lys  Gly Ser His Gln Ile  Ser Leu Asp Asn Pro  Asp Tyr Gln
1160              1165              1170

Gln Asp  Phe Phe Pro Lys Glu  Ala Lys Pro Asn Gly  Ile Phe Lys
1175              1180              1185

Gly Ser  Thr Ala Glu Asn Ala  Glu Tyr Leu Arg Val  Ala Pro Gln
1190              1195              1200

Ser Ser  Glu Phe Ile Gly Ala
1205              1210

<210> 8
<211> 510
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
1          5          10          15

Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
20          25          30

```

```

Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
  35                                40                                45

Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp
  50                                55                                60

Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr
  65                                70                                75                                80

Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn
  85                                90                                95

Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr
 100                                105                                110

Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val
 115                                120                                125

His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val
 130                                135                                140

Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg
 145                                150                                155                                160

Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys
 165                                170                                175

Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp
 180                                185                                190

Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met
 195                                200                                205

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val
 210                                215                                220

Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu
 225                                230                                235                                240

Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met
 245                                250                                255

```

Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe
 260 265 270
 Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser
 275 280 285
 His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu
 290 295 300
 Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu
 305 310 315 320
 Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr
 325 330 335
 Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp
 340 345 350
 Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr
 355 360 365
 Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr
 370 375 380
 Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp
 385 390 395 400
 Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys
 405 410 415
 Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser
 420 425 430
 Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser
 435 440 445
 Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro
 450 455 460

Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala
465 470 475 480

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu
485 490 495

Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr
500 505 510

<210> 9
<211> 944
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Asp Lys Asp Arg Pro Gly Pro Pro Ala Leu Asp Asp Asn Met Glu
1 5 10 15

Glu Glu Val Pro Ser Thr Ser Val Val Gln Glu Gln Val Ser Ala Gly
20 25 30

Asp Trp Glu Asn Val Leu Ile Glu Leu Ser Asp Ser Ser Ser Glu Lys
35 40 45

Glu Ala Glu Asp Ala His Leu Glu Pro Ala Gln Lys Gly Thr Lys Arg
50 55 60

Lys Arg Val Asp His Asp Ala Gly Gly Ser Ala Pro Ala Arg Pro Met
65 70 75 80

Leu Pro Pro Gln Pro Asp Leu Pro Gly Arg Glu Ala Ile Leu Arg Arg
85 90 95

Phe Pro Leu Asp Leu Arg Thr Leu Leu Gln Ala Ile Gly Ala Ala Ala
100 105 110

Thr Arg Ile Asp Thr Arg Ala Ile Asp Gln Phe Phe Gly Ser Gln Ile
115 120 125

Ser Asn Thr Glu Met Tyr Ile Met Tyr Ala Met Ala Ile Arg Gln Ala
130 135 140

Ile Arg Asp Arg Arg Arg Asn Pro Ala Ser Arg Arg Asp Gln Ala Lys
145 150 155 160

Trp Arg Leu Gln Thr Leu Ala Ala Gly Trp Pro Met Gly Tyr Gln Ala
165 170 175

Tyr Ser Ser Trp Met Tyr Ser Tyr Thr Asp His Gln Thr Thr Pro Thr
180 185 190

Phe Val His Leu Gln Ala Thr Leu Gly Cys Thr Gly Gly Arg Arg Cys
195 200 205

His Val Thr Phe Ser Ala Gly Thr Phe Lys Leu Pro Arg Cys Thr Pro
210 215 220

Gly Asp Arg Gln Trp Leu Tyr Val Gln Ser Ser Val Gly Asn Ile Val
225 230 235 240

Gln Ser Cys Asn Pro Arg Tyr Ser Ile Phe Phe Asp Tyr Met Ala Ile
245 250 255

His Arg Ser Leu Thr Lys Ile Trp Glu Glu Val Leu Thr Pro Asp Gln
260 265 270

Arg Val Ser Phe Met Glu Phe Leu Gly Phe Leu Gln Arg Thr Asp Leu
275 280 285

Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Val Ser Asp Ala Leu Gly Thr Thr Ser Ile
290 295 300

Gln Thr Pro Trp Ile Asp Asp Asn Pro Ser Thr Glu Thr Ala Gln Ala
305 310 315 320

Trp Asn Ala Gly Phe Leu Arg Gly Arg Ala Tyr Gly Ile Asp Leu Leu
325 330 335

Arg Thr Glu Gly Glu His Val Glu Gly Ala Thr Gly Glu Thr Arg Glu
340 345 350

Glu Ser Glu Asp Thr Glu Ser Asp Gly Asp Asp Glu Asp Leu Pro Cys

355	360	365
Ile Val Ser Arg Gly Gly Pro Lys Val Lys Arg Pro Pro Ile Phe Ile 370 375 380		
Arg Arg Leu His Arg Leu Leu Leu Met Arg Ala Gly Lys Arg Thr Glu 385 390 395 400		
Gln Gly Lys Glu Val Leu Glu Lys Ala Arg Gly Ser Thr Tyr Gly Thr 405 410 415		
Pro Arg Pro Pro Val Pro Lys Pro Arg Pro Glu Val Pro Gln Ser Asp 420 425 430		
Glu Thr Ala Thr Ser His Gly Ser Ala Gln Val Pro Glu Pro Pro Thr 435 440 445		
Ile His Leu Ala Ala Gln Gly Met Ala Tyr Pro Leu His Glu Gln His 450 455 460		
Gly Met Ala Pro Cys Pro Val Ala Gln Ala Pro Pro Thr Pro Leu Pro 465 470 475 480		
Pro Val Ser Pro Gly Asp Gln Leu Pro Gly Val Phe Ser Asp Gly Arg 485 490 495		
Val Ala Cys Ala Pro Val Pro Ala Pro Ala Gly Pro Ile Val Arg Pro 500 505 510		
Trp Glu Pro Ser Leu Thr Gln Ala Ala Gly Gln Ala Phe Ala Pro Val 515 520 525		
Arg Pro Gln His Met Pro Val Glu Pro Val Pro Val Pro Thr Val Ala 530 535 540		
Leu Glu Arg Pro Val Tyr Pro Lys Pro Val Arg Pro Ala Pro Pro Lys 545 550 555 560		
Ile Ala Met Gln Gly Pro Gly Glu Thr Ser Gly Ile Arg Arg Ala Arg 565 570 575		

Glu Arg Trp Arg Pro Ala Pro Trp Thr Pro Asn Pro Pro Arg Ser Pro
 580 585 590
 Ser Gln Met Ser Val Arg Asp Arg Leu Ala Arg Leu Arg Ala Glu Ala
 595 600 605
 Gln Val Lys Gln Ala Ser Val Glu Val Gln Pro Pro Gln Leu Thr Gln
 610 615 620
 Val Ser Pro Gln Gln Pro Met Glu Gly Pro Leu Val Pro Glu Gln Gln
 625 630 635 640
 Met Phe Pro Gly Ala Pro Phe Ser Gln Val Ala Asp Val Val Arg Ala
 645 650 655
 Pro Gly Val Pro Ala Met Gln Pro Gln Tyr Phe Asp Leu Pro Leu Ile
 660 665 670
 Gln Pro Ile Ser Gln Gly Ala Pro Val Ala Pro Leu Arg Ala Ser Met
 675 680 685
 Gly Pro Val Pro Pro Val Pro Ala Thr Gln Pro Gln Tyr Phe Asp Ile
 690 695 700
 Pro Leu Thr Glu Pro Ile Asn Gln Gly Ala Ser Ala Ala His Phe Leu
 705 710 715 720
 Pro Gln Gln Pro Met Glu Gly Pro Leu Val Pro Glu Gln Trp Met Phe
 725 730 735
 Pro Gly Ala Ala Leu Ser Gln Ser Val Arg Pro Gly Val Ala Gln Ser
 740 745 750
 Gln Tyr Phe Asp Leu Pro Leu Thr Gln Pro Ile Asn His Gly Ala Pro
 755 760 765
 Ala Ala His Phe Leu His Gln Pro Pro Met Glu Gly Pro Trp Val Pro
 770 775 780
 Glu Gln Trp Met Phe Gln Gly Ala Pro Pro Ser Gln Gly Thr Asp Val

```

785                      790                      795                      800

Val Gln His Gln Leu Asp Ala Leu Gly Tyr Thr Leu His Gly Leu Asn
      805                      810                      815

His Pro Gly Val Pro Val Ser Pro Ala Val Asn Gln Tyr His Leu Ser
      820                      825                      830

Gln Ala Ala Phe Gly Leu Pro Ile Asp Glu Asp Glu Ser Gly Glu Gly
      835                      840                      845

Ser Asp Thr Ser Glu Pro Cys Glu Ala Leu Asp Leu Ser Ile His Gly
      850                      855                      860

Arg Pro Cys Pro Gln Ala Pro Glu Trp Pro Val Gln Glu Glu Gly Gly
      865                      870                      875                      880

Gln Asp Ala Thr Glu Val Leu Asp Leu Ser Ile His Gly Arg Pro Arg
      885                      890                      895

Pro Arg Thr Pro Glu Trp Pro Val Gln Gly Glu Gly Gly Gln Asn Val
      900                      905                      910

Thr Gly Pro Glu Thr Arg Arg Val Val Val Ser Ala Val Val His Met
      915                      920                      925

Cys Gln Asp Asp Glu Phe Pro Asp Leu Gln Asp Pro Pro Asp Glu Ala
      930                      935                      940

<210> 10
<211> 641
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
1          5          10          15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
      20          25          30

```

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 35 40 45
 Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
 50 55 60
 Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
 65 70 75 80
 Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 85 90 95
 Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 130 135 140
 Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
 165 170 175
 Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190
 Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 195 200 205
 Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
 210 215 220
 Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 225 230 235 240
 Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 245 250 255

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
260 265 270

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
275 280 285

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly
290 295 300

Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
305 310 315 320

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
325 330 335

Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly Arg Gly Arg Gly Gly Ser Gly Gly
340 345 350

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Glu Arg Ala Arg Gly Gly Ser Arg Glu Arg
355 360 365

Ala Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Glu Lys Arg Pro Arg Ser Pro
370 375 380

Ser Ser Gln Ser Ser Ser Ser Gly Ser Pro Pro Arg Arg Pro Pro Pro
385 390 395 400

Gly Arg Arg Pro Phe Phe His Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu
405 410 415

Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly
420 425 430

Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr
435 440 445

Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp
450 455 460

Phe Gly Lys His Arg Gly Gln Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn
465 470 475 480

Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg
485 490 495

Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly
500 505 510

Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile
515 520 525

Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala
530 535 540

Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys
545 550 555 560

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
565 570 575

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
625 630 635 640

Glu

<210> 11
<211> 505
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Ser Leu Trp Leu Pro Ser Glu Ala Thr Val Tyr Leu Pro Pro Val
1 5 10 15

Pro Val Ser Lys Val Val Ser Thr Asp Glu Tyr Val Ala Arg Thr Asn
20 25 30

Ile Tyr Tyr His Ala Gly Thr Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro
35 40 45

Tyr Phe Pro Ile Lys Lys Pro Asn Asn Asn Lys Ile Leu Val Pro Lys
50 55 60

Val Ser Gly Leu Gln Tyr Arg Val Phe Arg Ile His Leu Pro Asp Pro
65 70 75 80

Asn Lys Phe Gly Phe Pro Asp Thr Ser Phe Tyr Asn Pro Asp Thr Gln
85 90 95

Arg Leu Val Trp Ala Cys Val Gly Val Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro
100 105 110

Leu Gly Val Gly Ile Ser Gly His Pro Leu Leu Asn Lys Leu Asp Asp
115 120 125

Thr Glu Asn Ala Ser Ala Tyr Ala Ala Asn Ala Gly Val Asp Asn Arg
130 135 140

Glu Cys Ile Ser Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Leu Ile Gly
145 150 155 160

Cys Lys Pro Pro Ile Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Ser Pro Cys Thr
165 170 175

Asn Val Ala Val Asn Pro Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Asn
180 185 190

Thr Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met
195 200 205

Asp Phe Thr Thr Leu Gln Ala Asn Lys Ser Glu Val Pro Leu Asp Ile

210	215	220
Cys Thr Ser Ile Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Ile Lys Met Val Ser Glu		
225	230	235 240
Pro Tyr Gly Asp Ser Leu Phe Phe Tyr Leu Arg Arg Glu Gln Met Phe		
	245	250 255
Val Arg His Leu Phe Asn Arg Ala Gly Ala Val Gly Glu Asn Val Pro		
	260	265 270
Asp Asp Leu Tyr Ile Lys Gly Ser Gly Ser Thr Ala Asn Leu Ala Ser		
	275	280 285
Ser Asn Tyr Phe Pro Thr Pro Ser Gly Ser Met Val Thr Ser Asp Ala		
	290	295 300
Gln Ile Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Arg Ala Gln Gly His Asn		
	305	310 315 320
Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr		
	325	330 335
Thr Arg Ser Thr Asn Met Ser Leu Cys Ala Ala Ile Ser Thr Ser Glu		
	340	345 350
Thr Thr Tyr Lys Asn Thr Asn Phe Lys Glu Tyr Leu Arg His Gly Glu		
	355	360 365
Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu Cys Lys Ile Thr Leu Thr		
	370	375 380
Ala Asp Val Met Thr Tyr Ile His Ser Met Asn Ser Thr Ile Leu Glu		
	385	390 395 400
Asp Trp Asn Phe Gly Leu Gln Pro Pro Pro Gly Gly Thr Leu Glu Asp		
	405	410 415
Thr Tyr Arg Phe Val Thr Ser Gln Ala Ile Ala Cys Gln Lys His Thr		
	420	425 430

Pro Pro Ala Pro Lys Glu Asp Pro Leu Lys Lys Tyr Thr Phe Trp Glu
435 440 445

Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ala Asp Leu Asp Gln Phe Pro Leu
450 455 460

Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ala Gly Leu Lys Ala Lys Pro Lys Phe
465 470 475 480

Thr Leu Gly Lys Arg Lys Ala Thr Pro Thr Thr Ser Ser Thr Ser Thr
485 490 495

Thr Ala Lys Arg Lys Lys Arg Lys Leu
500 505

<210> 12
<211> 1718
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Asn Gln Asn Thr Thr Glu Pro Val Ala Ala Thr Glu Thr Leu Ala
1 5 10 15

Glu Val Pro Glu His Val Leu Arg Gly Leu Pro Glu Glu Val Arg Leu
20 25 30

Phe Pro Ser Ala Val Asp Lys Thr Arg Ile Gly Val Trp Ala Thr Lys
35 40 45

Pro Ile Leu Lys Gly Lys Lys Phe Gly Pro Phe Val Gly Asp Lys Lys
50 55 60

Lys Arg Ser Gln Val Lys Asn Asn Val Tyr Met Trp Glu Val Tyr Tyr
65 70 75 80

Pro Asn Leu Gly Trp Met Cys Ile Asp Ala Thr Asp Pro Glu Lys Gly
85 90 95

Asn Trp Leu Arg Tyr Val Asn Trp Ala Cys Ser Gly Glu Glu Gln Asn
100 105 110

Leu Phe Pro Leu Glu Ile Asn Arg Ala Ile Tyr Tyr Lys Thr Leu Lys
 115 120 125
 Pro Ile Ala Pro Gly Glu Glu Leu Leu Val Trp Tyr Asn Gly Glu Asp
 130 135 140
 Asn Pro Glu Ile Ala Ala Ala Ile Glu Glu Glu Arg Ala Ser Ala Arg
 145 150 155 160
 Ser Lys Arg Ser Ser Pro Lys Ser Arg Lys Gly Lys Lys Lys Ser Gln
 165 170 175
 Glu Asn Lys Asn Lys Gly Asn Lys Ile Gln Asp Ile Gln Leu Lys Thr
 180 185 190
 Ser Glu Pro Asp Phe Thr Ser Ala Asn Met Arg Asp Ser Ala Glu Gly
 195 200 205
 Pro Lys Glu Asp Glu Glu Lys Pro Ser Ala Ser Ala Leu Glu Gln Pro
 210 215 220
 Ala Thr Leu Gln Glu Val Ala Ser Gln Glu Val Pro Pro Glu Leu Ala
 225 230 235 240
 Thr Pro Ala Pro Ala Trp Glu Pro Gln Pro Glu Pro Asp Glu Arg Leu
 245 250 255
 Glu Ala Ala Ala Cys Glu Val Asn Asp Leu Gly Glu Glu Glu Glu Glu
 260 265 270
 Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu
 275 280 285
 Leu Glu Asp Glu Gly Glu Glu Glu Ala Ser Met Pro Asn Glu Asn Ser
 290 295 300
 Val Lys Glu Pro Glu Ile Arg Cys Asp Glu Lys Pro Glu Asp Leu Leu
 305 310 315 320

Glu Glu Pro Lys Thr Thr Ser Glu Glu Thr Leu Glu Asp Cys Ser Glu
325 330 335

Val Thr Pro Ala Met Gln Ile Pro Arg Thr Lys Glu Glu Ala Asn Gly
340 345 350

Asp Val Phe Glu Thr Phe Met Phe Pro Cys Gln His Cys Glu Arg Lys
355 360 365

Phe Thr Thr Lys Gln Gly Leu Glu Arg His Met His Ile His Ile Ser
370 375 380

Thr Val Asn His Ala Phe Lys Cys Lys Tyr Cys Gly Lys Ala Phe Gly
385 390 395 400

Thr Gln Ile Asn Arg Arg Arg His Glu Arg Arg His Glu Ala Gly Leu
405 410 415

Lys Arg Lys Pro Ser Gln Thr Leu Gln Pro Ser Glu Asp Leu Ala Asp
420 425 430

Gly Lys Ala Ser Gly Glu Asn Val Ala Ser Lys Asp Asp Ser Ser Pro
435 440 445

Pro Ser Leu Gly Pro Asp Cys Leu Ile Met Asn Ser Glu Lys Ala Ser
450 455 460

Gln Asp Thr Ile Asn Ser Ser Val Val Glu Glu Asn Gly Glu Val Lys
465 470 475 480

Glu Leu His Pro Cys Lys Tyr Cys Lys Lys Val Phe Gly Thr His Thr
485 490 495

Asn Met Arg Arg His Gln Arg Arg Val His Glu Arg His Leu Ile Pro
500 505 510

Lys Gly Val Arg Arg Lys Gly Gly Leu Glu Glu Pro Gln Pro Pro Ala
515 520 525

Glu Gln Ala Gln Ala Thr Gln Asn Val Tyr Val Pro Ser Thr Glu Pro
530 535 540

Glu Glu Glu Gly Glu Ala Asp Asp Val Tyr Ile Met Asp Ile Ser Ser
545 550 555 560

Asn Ile Ser Glu Asn Leu Asn Tyr Tyr Ile Asp Gly Lys Ile Gln Thr
565 570 575

Asn Asn Asn Thr Ser Asn Cys Asp Val Ile Glu Met Glu Ser Ala Ser
580 585 590

Ala Asp Leu Tyr Gly Ile Asn Cys Leu Leu Thr Pro Val Thr Val Glu
595 600 605

Ile Thr Gln Asn Ile Lys Thr Thr Gln Val Pro Val Thr Glu Asp Leu
610 615 620

Pro Lys Glu Pro Leu Gly Ser Thr Asn Ser Glu Ala Lys Lys Arg Arg
625 630 635 640

Thr Ala Ser Pro Pro Ala Leu Pro Lys Ile Lys Ala Glu Thr Asp Ser
645 650 655

Asp Pro Met Val Pro Ser Cys Ser Leu Ser Leu Pro Leu Ser Ile Ser
660 665 670

Thr Thr Glu Ala Val Ser Phe His Lys Glu Lys Ser Val Tyr Leu Ser
675 680 685

Ser Lys Leu Lys Gln Leu Leu Gln Thr Gln Asp Lys Leu Thr Pro Ala
690 695 700

Gly Ile Ser Ala Thr Glu Ile Ala Lys Leu Gly Pro Val Cys Val Ser
705 710 715 720

Ala Pro Ala Ser Met Leu Pro Val Thr Ser Ser Arg Phe Lys Arg Arg
725 730 735

Thr Ser Ser Pro Pro Ser Ser Pro Gln His Ser Pro Ala Leu Arg Asp
740 745 750

Phe Gly Lys Pro Ser Asp Gly Lys Ala Ala Trp Thr Asp Ala Gly Leu
 755 760 765
 Thr Ser Lys Lys Ser Lys Leu Glu Ser His Ser Asp Ser Pro Ala Trp
 770 775 780
 Ser Leu Ser Gly Arg Asp Glu Arg Glu Thr Val Ser Pro Pro Cys Phe
 785 790 795 800
 Asp Glu Tyr Lys Met Ser Lys Glu Trp Thr Ala Ser Ser Ala Phe Ser
 805 810 815
 Ser Val Cys Asn Gln Gln Pro Leu Asp Leu Ser Ser Gly Val Lys Gln
 820 825 830
 Lys Ala Glu Gly Thr Gly Lys Thr Pro Val Gln Trp Glu Ser Val Leu
 835 840 845
 Asp Leu Ser Val His Lys Lys His Cys Ser Asp Ser Glu Gly Lys Glu
 850 855 860
 Phe Lys Glu Ser His Ser Val Gln Pro Thr Cys Ser Ala Val Lys Lys
 865 870 875 880
 Arg Lys Pro Thr Thr Cys Met Leu Gln Lys Val Leu Leu Asn Glu Tyr
 885 890 895
 Asn Gly Ile Asp Leu Pro Val Glu Asn Pro Ala Asp Gly Thr Arg Ser
 900 905 910
 Pro Ser Pro Cys Lys Ser Leu Glu Ala Gln Pro Asp Pro Asp Leu Gly
 915 920 925
 Pro Gly Ser Gly Phe Pro Ala Pro Thr Val Glu Ser Thr Pro Asp Val
 930 935 940
 Cys Pro Ser Ser Pro Ala Leu Gln Thr Pro Ser Leu Ser Ser Gly Gln
 945 950 955 960
 Leu Pro Pro Leu Leu Ile Pro Thr Asp Pro Ser Ser Pro Pro Pro Cys
 965 970 975

Pro Pro Val Leu Thr Val Ala Thr Pro Pro Pro Pro Leu Leu Pro Thr
980 985 990

Val Pro Leu Pro Ala Pro Ser Ser Ser Ala Ser Pro His Pro Cys Pro
995 1000 1005

Ser Pro Leu Ser Asn Ala Thr Ala Gln Ser Pro Leu Pro Ile Leu
1010 1015 1020

Ser Pro Thr Val Ser Pro Ser Pro Ser Pro Ile Pro Pro Val Glu
1025 1030 1035

Pro Leu Met Ser Ala Ala Ser Pro Gly Pro Pro Thr Leu Ser Ser
1040 1045 1050

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser Ser Ser
1055 1060 1065

Ser Ser Ser Ser Pro Ser Pro Pro Pro Leu Ser Ala Ile Ser Ser
1070 1075 1080

Val Val Ser Ser Gly Asp Asn Leu Glu Ala Ser Leu Pro Met Ile
1085 1090 1095

Ser Phe Lys Gln Glu Glu Leu Glu Asn Glu Gly Leu Lys Pro Arg
1100 1105 1110

Glu Glu Pro Gln Ser Ala Ala Glu Gln Asp Val Val Val Gln Glu
1115 1120 1125

Thr Phe Asn Lys Asn Phe Val Cys Asn Val Cys Glu Ser Pro Phe
1130 1135 1140

Leu Ser Ile Lys Asp Leu Thr Lys His Leu Ser Ile His Ala Glu
1145 1150 1155

Glu Trp Pro Phe Lys Cys Glu Phe Cys Val Gln Leu Phe Lys Asp
1160 1165 1170

Lys Thr	Asp Leu Ser Glu His	Arg Phe Leu Leu His	Gly Val Gly
1175	1180	1185	
Asn Ile	Phe Val Cys Ser Val	Cys Lys Lys Glu Phe	Ala Phe Leu
1190	1195	1200	
Cys Asn	Leu Gln Gln His Gln	Arg Asp Leu His Pro	Asp Lys Val
1205	1210	1215	
Cys Thr	His His Glu Phe Glu	Ser Gly Thr Leu Arg	Pro Gln Asn
1220	1225	1230	
Phe Thr	Asp Pro Ser Lys Ala	His Val Glu His Met	Gln Ser Leu
1235	1240	1245	
Pro Glu	Asp Pro Leu Glu Thr	Ser Lys Glu Glu Glu	Glu Leu Asn
1250	1255	1260	
Asp Ser	Ser Glu Glu Leu Tyr	Thr Thr Ile Lys Ile	Met Ala Ser
1265	1270	1275	
Gly Ile	Lys Thr Lys Asp Pro	Asp Val Arg Leu Gly	Leu Asn Gln
1280	1285	1290	
His Tyr	Pro Ser Phe Lys Pro	Pro Pro Phe Gln Tyr	His His Arg
1295	1300	1305	
Asn Pro	Met Gly Ile Gly Val	Thr Ala Thr Asn Phe	Thr Thr His
1310	1315	1320	
Asn Ile	Pro Gln Thr Phe Thr	Thr Ala Ile Arg Cys	Thr Lys Cys
1325	1330	1335	
Gly Lys	Gly Val Asp Asn Met	Pro Glu Leu His Lys	His Ile Leu
1340	1345	1350	
Ala Cys	Ala Ser Ala Ser Asp	Lys Lys Arg Tyr Thr	Pro Lys Lys
1355	1360	1365	
Asn Pro	Val Pro Leu Lys Gln	Thr Val Gln Pro Lys	Asn Gly Val
1370	1375	1380	

Val	Val	Leu	Asp	Asn	Ser	Gly	Lys	Asn	Ala	Phe	Arg	Arg	Met	Gly
1385						1390						1395		
Gln	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Ser	Val	Glu	Leu	Ser	Lys	Met	Ser
1400						1405						1410		
Ser	Asn	Lys	Leu	Lys	Leu	Asn	Ala	Leu	Lys	Lys	Lys	Asn	Gln	Leu
1415						1420						1425		
Val	Gln	Lys	Ala	Ile	Leu	Gln	Lys	Asn	Lys	Ser	Ala	Lys	Gln	Lys
1430						1435						1440		
Ala	Asp	Leu	Lys	Asn	Ala	Cys	Glu	Ser	Ser	Ser	His	Ile	Cys	Pro
1445						1450						1455		
Tyr	Cys	Asn	Arg	Glu	Phe	Thr	Tyr	Ile	Gly	Ser	Leu	Asn	Lys	His
1460						1465						1470		
Ala	Ala	Phe	Ser	Cys	Pro	Lys	Lys	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Lys	Lys
1475						1480						1485		
Lys	Val	Ser	His	Ser	Ser	Lys	Lys	Gly	Gly	His	Ser	Ser	Pro	Ala
1490						1495						1500		
Ser	Ser	Asp	Lys	Asn	Ser	Asn	Ser	Asn	His	Arg	Arg	Arg	Thr	Ala
1505						1510						1515		
Asp	Ala	Glu	Ile	Lys	Met	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Lys
1520						1525						1530		
Thr	Arg	Ala	Arg	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Gln	Val	Pro	Leu	Pro	Ser
1535						1540						1545		
Ser	Ser	Phe	Arg	Ser	Lys	Gln	Asn	Val	Lys	Phe	Ala	Ala	Ser	Val
1550						1555						1560		
Lys	Ser	Lys	Lys	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	Arg	Asn	Ser	Ser	Pro
1565						1570						1575		


```

Ile Arg Met Ala Lys Ile Thr His Val Glu Gly Lys Lys Pro Lys
1580                               1585                   1590

Ala Val Ala Lys Asn His Ser Ala Gln Leu Ser Ser Lys Thr Ser
1595                               1600                   1605

Arg Ser Leu His Val Arg Val Gln Lys Ser Lys Ala Val Leu Gln
1610                               1615                   1620

Ser Lys Ser Thr Leu Ala Ser Lys Lys Arg Thr Asp Arg Phe Asn
1625                               1630                   1635

Ile Lys Ser Arg Glu Arg Ser Gly Gly Pro Val Thr Arg Ser Leu
1640                               1645                   1650

Gln Leu Ala Ala Ala Ala Asp Leu Ser Glu Asn Lys Arg Glu Asp
1655                               1660                   1665

Gly Ser Ala Lys Gln Glu Leu Lys Asp Phe Ser Tyr Ser Leu Arg
1670                               1675                   1680

Leu Ala Ser Arg Cys Ser Pro Pro Ala Ala Pro Tyr Ile Thr Arg
1685                               1690                   1695

Gln Tyr Arg Lys Val Lys Ala Pro Ala Ala Ala Gln Phe Gln Gly
1700                               1705                   1710

Pro Phe Phe Lys Glu
1715

<210> 13
<211> 230
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Met Glu Gly Gln Arg Trp Leu Pro Leu Glu Ala Asn Pro Glu Val Thr
1 5 10 15

Asn Gln Phe Leu Lys Gln Leu Gly Leu His Pro Asn Trp Gln Phe Val
20 25 30

```

```

Asp Val Tyr Gly Met Asp Pro Glu Leu Leu Ser Met Val Pro Arg Pro
 35              40              45

Val Cys Ala Val Leu Leu Leu Phe Pro Ile Thr Glu Lys Tyr Glu Val
 50              55              60

Phe Arg Thr Glu Glu Glu Glu Lys Ile Lys Ser Gln Gly Gln Asp Val
 65              70              75              80

Thr Ser Ser Val Tyr Phe Met Lys Gln Thr Ile Ser Asn Ala Cys Gly
 85              90              95

Thr Ile Gly Leu Ile His Ala Ile Ala Asn Asn Lys Asp Lys Met His
100              105              110

Phe Glu Ser Gly Ser Thr Leu Lys Lys Phe Leu Glu Glu Ser Val Ser
115              120              125

Met Ser Pro Glu Glu Arg Ala Arg Tyr Leu Glu Asn Tyr Asp Ala Ile
130              135              140

Arg Val Thr His Glu Thr Ser Ala His Glu Gly Gln Thr Glu Ala Pro
145              150              155              160

Ser Ile Asp Glu Lys Val Asp Leu His Phe Ile Ala Leu Val His Val
165              170              175

Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp Gly Arg Lys Pro Phe Pro Ile Asn
180              185              190

His Gly Glu Thr Ser Asp Glu Thr Leu Leu Glu Asp Ala Ile Glu Val
195              200              205

Cys Lys Lys Phe Met Glu Arg Asp Pro Asp Glu Leu Arg Phe Asn Ala
210              215              220

Ile Ala Leu Ser Ala Ala
225              230

```

<210> 14

<211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Asn Gly Pro Ala Asp Gly Glu Val Asp Tyr Lys Lys Lys Tyr Arg
 1 5 10 15

Asn Leu Lys Arg Lys Leu Lys Phe Leu Ile Tyr Glu His Glu Cys Phe
 20 25 30

Gln Glu Glu Leu Arg Lys Ala Gln Arg Lys Leu Leu Lys Val Ser Arg
 35 40 45

Asp Lys Ser Phe Leu Leu Asp Arg Leu Leu Gln Tyr Glu Asn Val Asp
 50 55 60

Glu Asp Ser Ser Asp Ser Asp Ala Thr Ala Ser Ser Asp Asn Ser Glu
 65 70 75 80

Thr Glu Gly Thr Pro Lys Leu Ser Asp Thr Pro Ala Pro Lys Arg Lys
 85 90 95

Arg Ser Pro Pro Leu Gly Gly Ala Pro Ser Pro Ser Ser Leu Ser Leu
 100 105 110

Pro Pro Ser Thr Gly Phe Pro Leu Gln Ala Ser Gly Val Pro Ser Pro
 115 120 125

Tyr Leu Ser Ser Leu Ala Ser Ser Arg Tyr Pro Pro Phe Pro Ser Asp
 130 135 140

Tyr Leu Ala Leu Gln Leu Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Pro Lys Arg
 145 150 155 160

Glu Lys Arg Pro Arg Leu Pro Arg Lys Leu Lys Met Ala Val Gly Pro
 165 170 175

Pro Asp Cys Pro Val Gly Gly Pro Leu Thr Phe Pro Gly Arg Gly Ser
 180 185 190

Gly Ala Gly Val Gly Thr Thr Leu Thr Pro Leu Pro Pro Pro Lys Met
195 200 205

Pro Pro Pro Thr Ile Leu Ser Thr Val Pro Arg Gln Met Phe Ser Asp
210 215 220

Ala Gly Ser Gly Asp Asp Ala Leu Asp Gly Asp Asp Asp Leu Val Ile
225 230 235 240

Asp Ile Pro Glu

<210> 15
<211> 271
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Asn Leu Leu Gly Ser Arg Arg Val Phe Ser Lys Lys Cys Arg Leu
1 5 10 15

Val Lys Phe Ser Met Val Ala Leu Val Ser Ala Thr Met Ala Val Thr
20 25 30

Thr Val Thr Leu Glu Asn Thr Ala Leu Ala Arg Gln Thr Gln Val Ser
35 40 45

Asn Asp Val Val Leu Asn Asp Gly Ala Ser Lys Tyr Leu Asn Glu Ala
50 55 60

Leu Ala Trp Thr Phe Asn Asp Ser Pro Asn Tyr Tyr Lys Thr Leu Gly
65 70 75 80

Thr Ser Gln Ile Thr Pro Ala Leu Phe Pro Lys Ala Gly Asp Ile Leu
85 90 95

Tyr Ser Lys Leu Asp Glu Leu Gly Arg Thr Arg Thr Ala Arg Gly Thr
100 105 110

Leu Thr Tyr Ala Asn Val Glu Gly Ser Tyr Gly Val Arg Gln Ser Phe
115 120 125

Gly Lys Asn Gln Asn Pro Ala Gly Trp Thr Gly Asn Pro Asn His Val
 130 135 140
 Lys Tyr Lys Ile Glu Trp Leu Asn Gly Leu Ser Tyr Val Gly Asp Phe
 145 150 155 160
 Trp Asn Arg Ser His Leu Ile Ala Asp Ser Leu Gly Gly Asp Ala Leu
 165 170 175
 Arg Val Asn Ala Val Thr Gly Thr Arg Thr Gln Asn Val Gly Gly Arg
 180 185 190
 Asp Gln Lys Gly Gly Met Arg Tyr Thr Glu Gln Arg Ala Gln Glu Trp
 195 200 205
 Leu Glu Ala Asn Arg Asp Gly Tyr Leu Tyr Tyr Glu Val Ala Pro Ile
 210 215 220
 Tyr Asn Ala Asp Glu Leu Ile Pro Arg Ala Val Val Val Ser Met Gln
 225 230 235 240
 Ser Ser Asp Asn Thr Ile Asn Glu Lys Val Leu Val Tyr Asn Thr Ala
 245 250 255
 Asn Gly Tyr Thr Ile Asn Tyr His Asn Gly Thr Pro Thr Gln Lys
 260 265 270

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Композиція для експансії лімфоцитів *in vitro*, яка містить інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 15 (IL-15) та інтерлейкін 21 (IL-21), де композиція знаходиться в рідкій формі, концентрація IL-2 в рідкій композиції знаходиться в діапазоні від 500 до 2000 МО/мл, концентрація IL-15 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл, і де концентрація IL-21 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл.
- 10 2. Композиція за п. 1, яка **відрізняється** тим, що концентрація IL-2 в рідкій композиції має значення в діапазоні від 800 до 1200 МО/мл.
3. Композиція за п. 2, яка **відрізняється** тим, що концентрація IL-15 має значення в діапазоні від 2 до 50 нг/мл, ще краще в діапазоні від 5 до 20 нг/мл.
- 15 4. Композиція за будь-яким з пп. 2 або 3, яка **відрізняється** тим, що концентрація IL-21 має значення в діапазоні від 2 до 50 нг/мл, краще в діапазоні від 5 до 20 нг/мл.
5. Спосіб одержання популяції клінічно релевантних лімфоцитів, який включає стадії:
 - забезпечення зразка, отриманого з організму ссавця, зокрема зразка тканини або зразка рідини організму, що містить принаймні один лімфоцит та, необов'язково, виділення клітин зі зразка з організму,
 - 20 - культивування зразка з організму *in vitro* для експансії та/або стимулювання лімфоцитів у зразку, причому культивування включає використання IL-2, IL-15 та/або IL-21 у композиції знаходиться в рідкій формі, де концентрація IL-2 в рідкій композиції знаходиться в діапазоні від 500 до 2000 МО/мл, концентрація IL-15 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл і де концентрація IL-21 знаходиться в діапазоні від 0,1 до 100 нг/мл,
 - 25 - та визначення присутності клінічно релевантного лімфоцита у культивованому зразку, де культивування *in vitro* включає першу стадію експансії, що включає інкубацію у культуральному середовищі, що містить IL-2, IL-15 та IL-21, доки лімфоцити не стануть детектованими, і де культивування *in vitro* включає другу стадію експансії з інкубацією у культуральному

середовищі, що містить живильні клітини та/або антитіло проти CD3 на додаток до IL-2, IL-15 та IL-21.

6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що клінічно релевантні лімфоцити вибирають з пухлина-реактивних лімфоцитів, патоген-реактивних лімфоцитів та аутоімунних реактивних лімфоцитів, краще пухлина-реактивних лімфоцитів.

7. Спосіб за п. 5 або 6, який **відрізняється** тим, що зразок з організму вибирають з групи, що складається з периферичної крові, пуповинної крові, кісткового мозку, лімфатичних вузлів печінки, плеврального випоту, грудної клітини, черевної порожнини, синовіальної рідини, очередини, ретроперитонеального простору, виличкової залози та пухлини.

8. Спосіб за п. 7, який **відрізняється** тим, що зразок з організму вибирають з периферичної крові.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 5-7, який **відрізняється** тим, що ссавця, зокрема людину, вибирають із ссавця з онкологічною хворобою, ссавця з ризиком розвитку онкологічної хвороби, ссавця з інфекційною хворобою, ссавця з ризиком розвитку інфекційної хвороби, ссавця з аутоімунною хворобою, ссавця з ризиком розвитку аутоімунної хвороби.

10. Спосіб за будь-яким з пп. 5-9, який **відрізняється** тим, що час інкубації першої стадії експансії має значення в діапазоні від 6 годин до 180 днів, краще в діапазоні від 4 до 10, ще краще в діапазоні від 6 до 8 днів, найкраще приблизно 7 днів.

11. Спосіб за будь-яким з пп. 5-10, який **відрізняється** тим, що співвідношення живильних клітин до лімфоцитів має значення в діапазоні від 1:1 до 1:100, краще в діапазоні від 1:2 до 1:50, ще краще в діапазоні від 1:5 до 1:20, найкраще приблизно 1:10.

12. Спосіб за будь-яким з пп. 5-11, який **відрізняється** тим, що популяція клінічно релевантних лімфоцитів є моноклональною, олігоклональною або поліклональною.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 5-12, який **відрізняється** тим, що культуральне середовище першої та/або другої стадії експансії включає принаймні один антиген для проведення експансії.

14. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що антиген для проведення експансії є фрагментом TAA, зокрема пептидом, що містить принаймні вісім послідовних амінокислот амінокислотної послідовності, яка є принаймні на 80 % ідентичною амінокислотним послідовностям SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, або SEQ ID NO: 14.

15. Спосіб за будь-яким з пп. 5-14, який **відрізняється** тим, що *in vitro* культивування додатково включає стадію перефокусування, яка включає інкубацію в культуральному середовищі, що містить клітини для проведення перефокусування.

16. Спосіб за п. 15, який **відрізняється** тим, що час стадії перефокусування має значення в діапазоні від 1 до 6 днів, краще від 1 до 3 днів.

17. Спосіб за п. 15 або 16, який **відрізняється** тим, що співвідношення клітин для проведення перефокусування до лімфоцитів має значення в діапазоні від 1:1 до 1:100, краще в діапазоні від 1:5 до 1:10.

18. Спосіб за будь-яким з пп. 5-17, який **відрізняється** тим, що культивування включає додавання промоторної сполуки для промотування експансії специфічної підгрупи лімфоцитів, зокрема гамма-дельта Т-клітин (γδ-Т-клітин).

19. Спосіб за будь-яким з пп. 5-18, який **відрізняється** тим, що додатково включає виділення популяції клінічно релевантних лімфоцитів з підданої експансії клітинної культури.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 5-19, який **відрізняється** тим, що тестування присутності клінічно релевантних лімфоцитів включає використання антигенів для проведення оцінки.

21. Спосіб за п. 20, який **відрізняється** тим, що антигени для проведення оцінки презентують культивованому зразку в формі, вибраній з клітин, зокрема пухлинних клітин, одержаних від того ж самого ссавця, що й культивований зразок (аутологічні клітини), принаймні частково генетично відповідних алогенних клітин, зокрема пухлинних клітин, або клітин, що експресують клінічно релевантні антигени як трансген.

22. Спосіб за п. 20 або 21, який **відрізняється** тим, що тестування присутності клінічно реактивних лімфоцитів включає введення в контакт лімфоцитів з принаймні одним клінічно релевантним антигеном та визначення зміни будь-чого з продукування цитокінів, зокрема продукування INFγ, проліферації клітин, цитотоксичності, сигналізації та/або внутрішньоклітинного фосфорилування.

23. Клінічно релевантний лімфоцит, одержаний у спосіб за будь-яким з пп. 5-22, який **відрізняється** тим, що клінічно релевантний лімфоцит вибирають з В-клітини, природної клітини-вбивці та Т-клітини, де Т-клітину вибирають з хелперної Т-клітини (T_H-клітини або CD4⁺-Т-клітини), зокрема T_H1-клітини, цитотоксичної Т-клітини (T_C-клітини або CD8⁺-Т-клітини), зокрема CD8⁺CXCR3⁺ Т-клітини, Т-клітини пам'яті, зокрема Т-клітини центральної пам'яті (T_{CM}-

клітини), Т-клітини пам'яті стовбурових клітин (T_{SCM}) або клітини периферичної пам'яті (T_{PM} -клітини), гамма-дельта Т-клітини ($\gamma\delta$ -Т-клітини), природної Т-клітини-вбивці, інваріантної Т-клітини слизової оболонки (MAIT), подвійно негативної Т-клітини ($CD3^+CD4^-CD8^-$ Т-клітини).

25. Популяція лімфоцитів, одержана у спосіб за будь-яким з пп. 5-22, що включає популяцію клінічно релевантних лімфоцитів.

26. Популяція лімфоцитів за п. 25, яка характеризується однією чи декількома з таких ознак:

- процентна частка Treg, обчислена від загальної кількості Т-клітин, є нижчою 5 %, краще нижчою 3 %;

- процентна частка T_H -клітин, обчислена від загальної кількості T_H -клітин, складає принаймні 50 %, краще принаймні 70 %, ще краще принаймні 80 %,

10

- процентна частка $CXCR3^+$ Т-клітин, обчислена від загальної кількості $CD8^+$ Т-клітин, складає принаймні 50 %, краще принаймні 70 %, ще краще принаймні 80 %,

10

- процентна частка $4-1BB^+$ Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 2 %, ще краще принаймні 2,5 %,

15

- процентна частка $CD117^+$ Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 2 %, ще краще принаймні 2,5 %,

15

- процентна частка $CD3^+CD4^-CD8^-$ клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 3 %, ще краще принаймні 5 %; і

20

- процентна частка $\gamma\delta$ -Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 3 %, ще краще принаймні 5 %.

27. Популяція лімфоцитів за п. 25 або 26, яка характеризується однією чи декількома з таких ознак:

- процентна частка прекурсорних Т-клітин ($CD45RA^+CCR7^+$), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 2 %, ще краще принаймні 3 %;

- процентна частка Т-клітин центральної пам'яті ($CD45RA^-CCR7^+$), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 2 %, краще принаймні 5 %, ще краще принаймні 10 %;

- процентна частка Т-клітин периферичної пам'яті ($CD45RA^-CCR7^-$), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 2 %, краще принаймні 5 %, ще краще принаймні 10 %; і

25

- процентна частка ефektorних Т-клітин ($CD45RA^+CCR7^-$), обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 1 %, краще принаймні 3 %, ще краще принаймні 5 %.

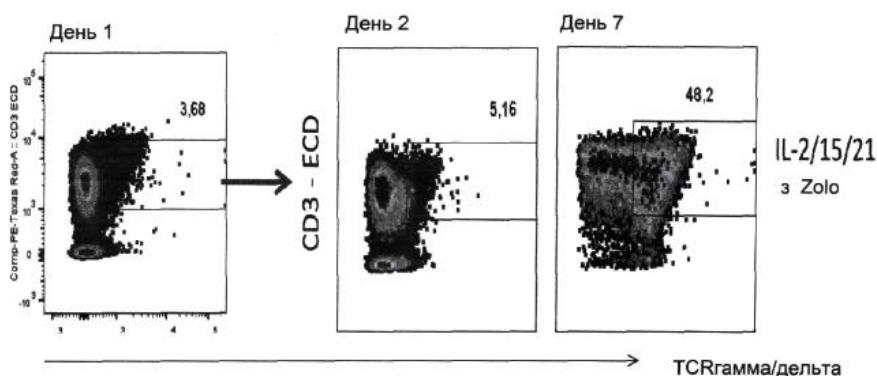
28. Популяція лімфоцитів за будь-яким з пп. 25-27, яка характеризується однією чи декількома з таких ознак:

- процентна частка клінічно релевантних Т-клітин, обчислена від загальної кількості Т-клітин, складає принаймні 0,1 % при визначенні за мультимерними розчинними комплексами МНС-пептид або внутрішньоклітинним продукуванням цитокінів;

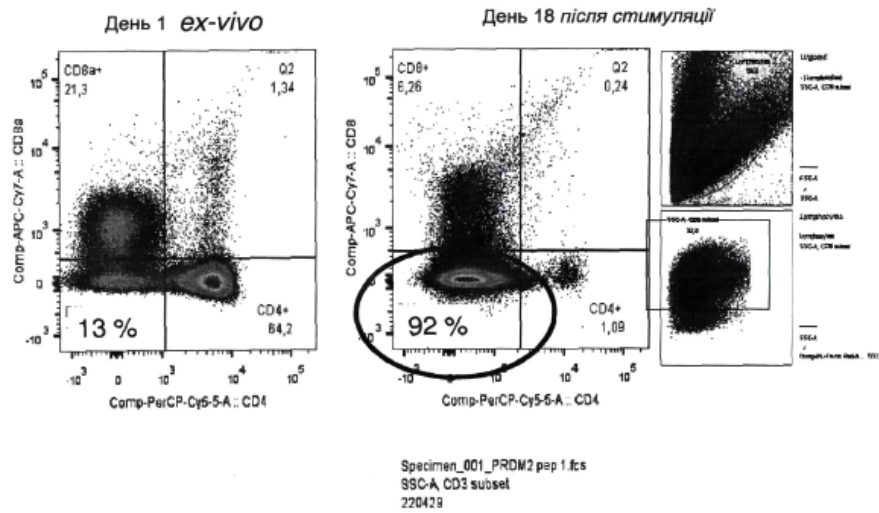
- внутрішньоклітинне продукування цитокінів після антигенної стимуляції має значення, яке принаймні в 2 рази перевищує стандартний відхил без антигенної стимуляції; і

35

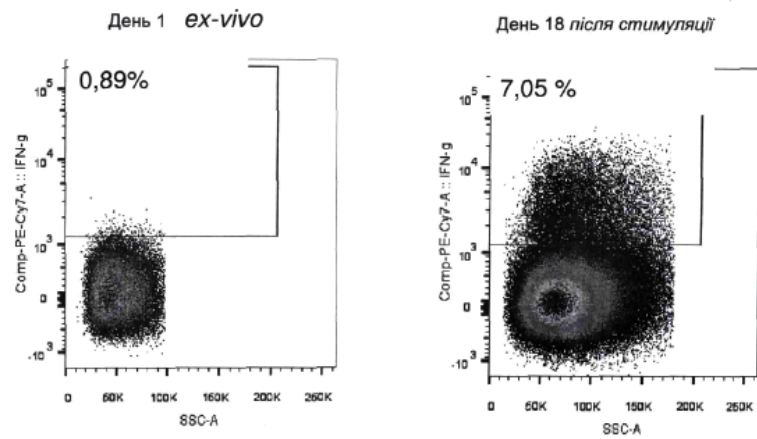
- індукція $CD107a$ після антигенної стимуляції має значення, яке принаймні в 2 рази перевищує стандартний відхил без антигенної стимуляції.



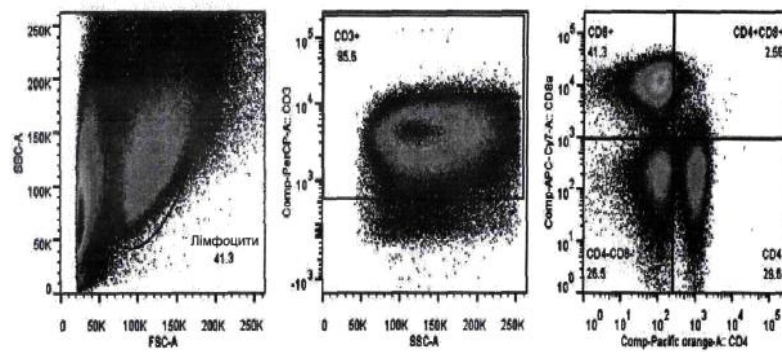
ФІГ. 1



ФІГ. 2



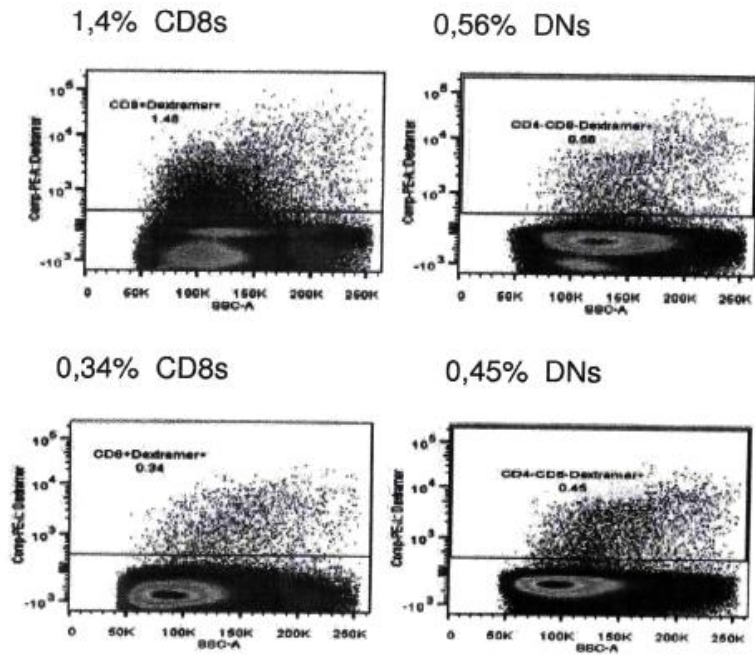
ФІГ. 3



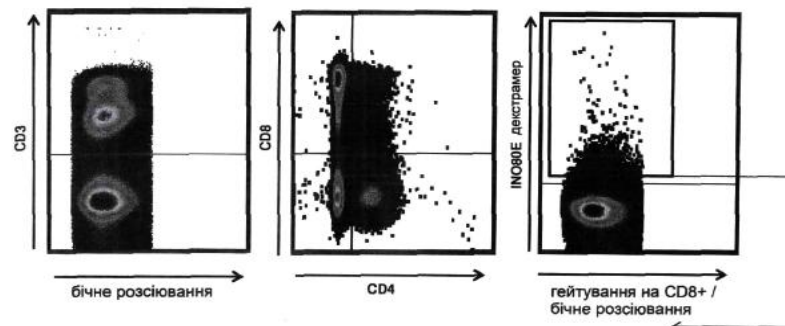
ФІГ. 4A

ФІГ. 4B

ФІГ. 4C



ФІГ. 5



ФІГ. 6A

ФІГ. 6B

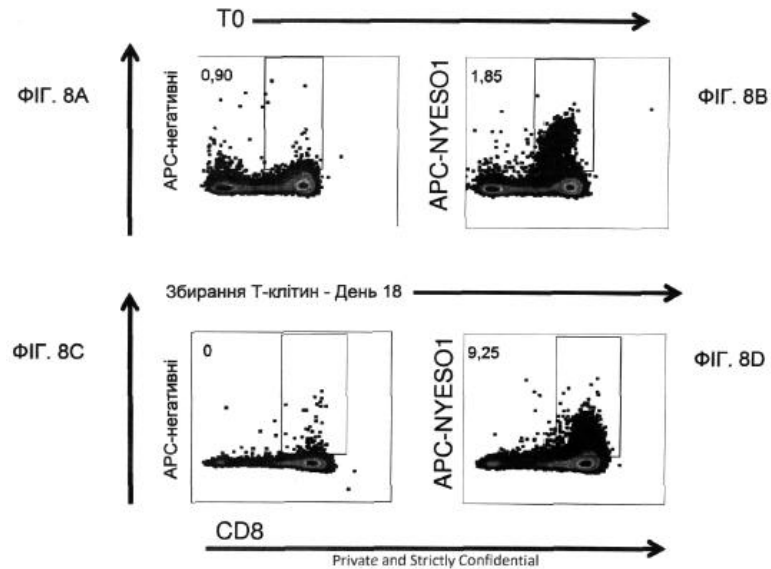
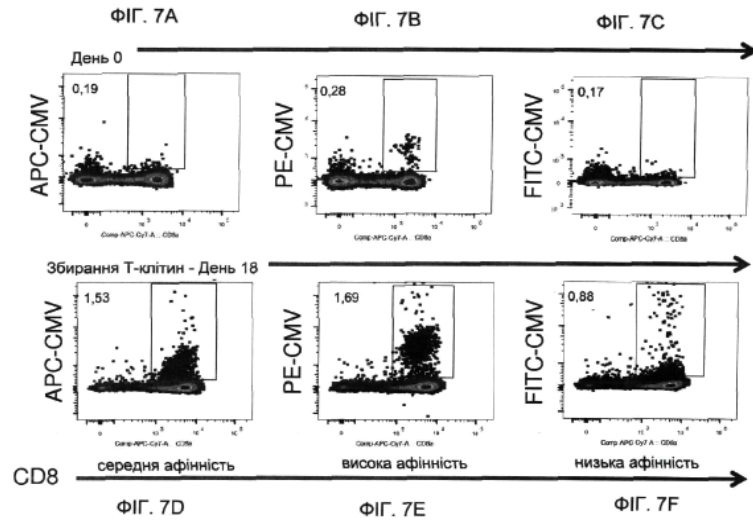
ФІГ. 6C



ФІГ. 6D

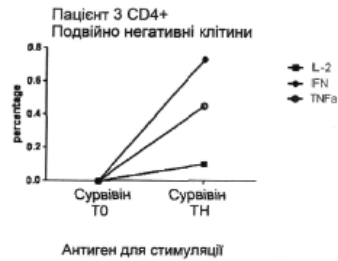
ФІГ. 6E

ФІГ. 6F

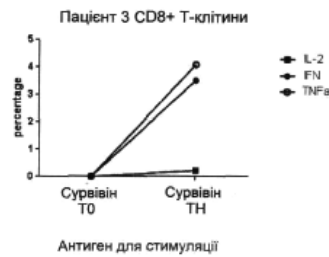




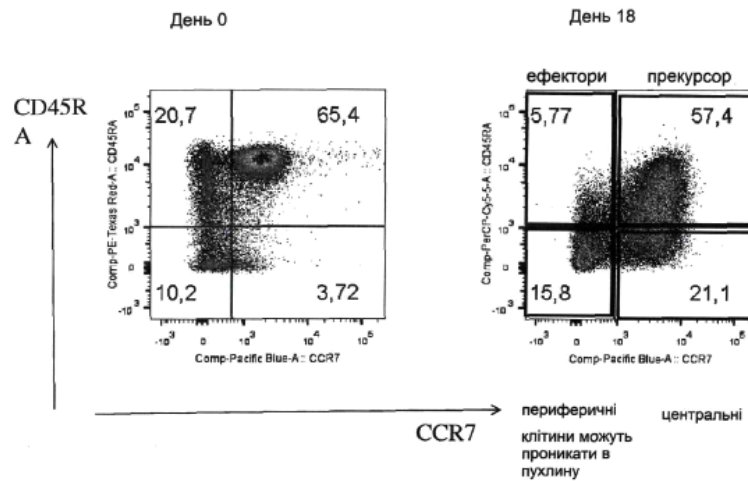
ФІГ. 9А



ФІГ. 9В

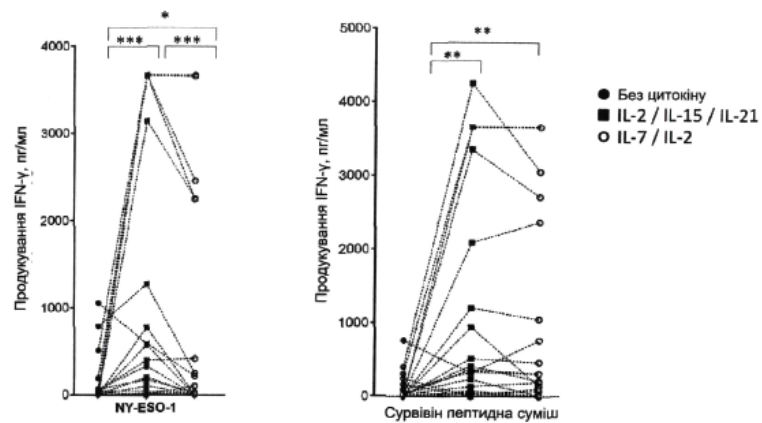
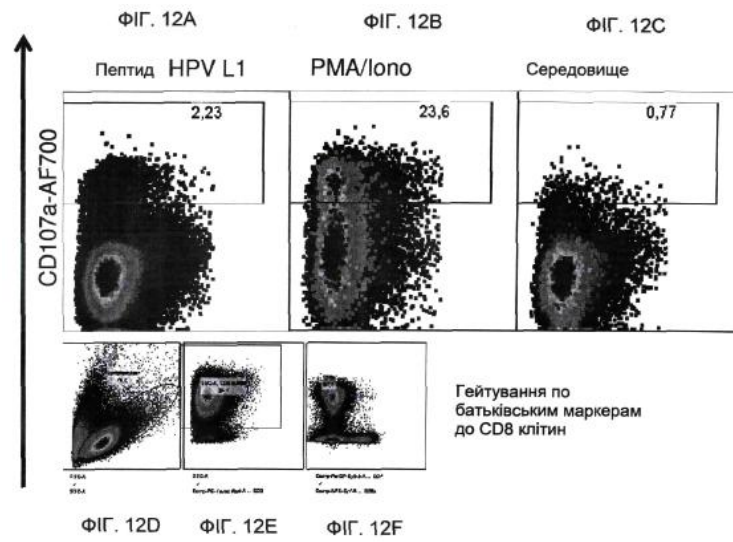
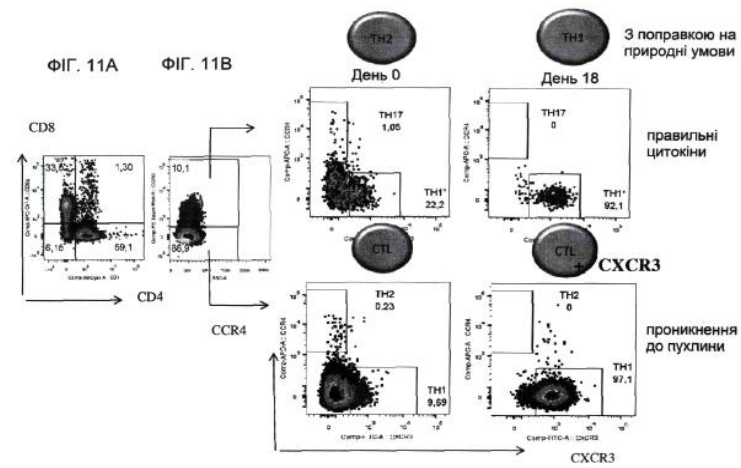


ФІГ. 9С

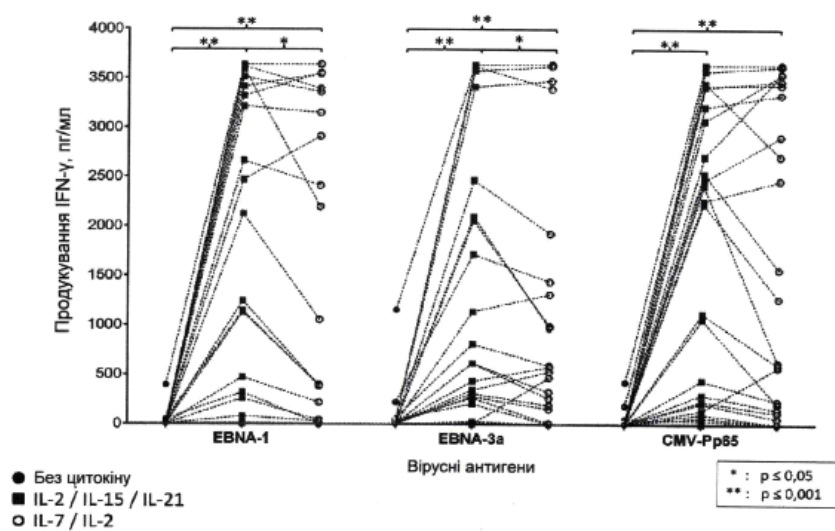


ФІГ. 10А

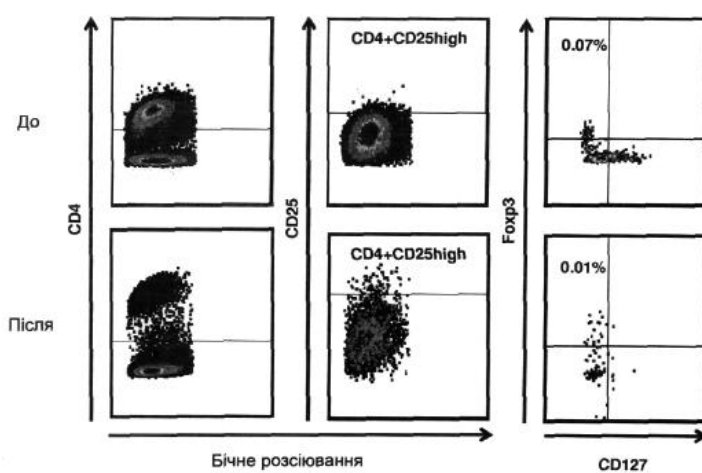
ФІГ. 10В



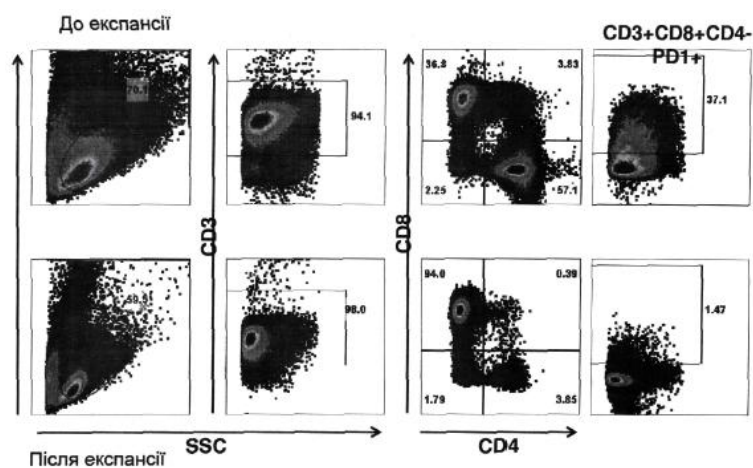
ФІГ. 13



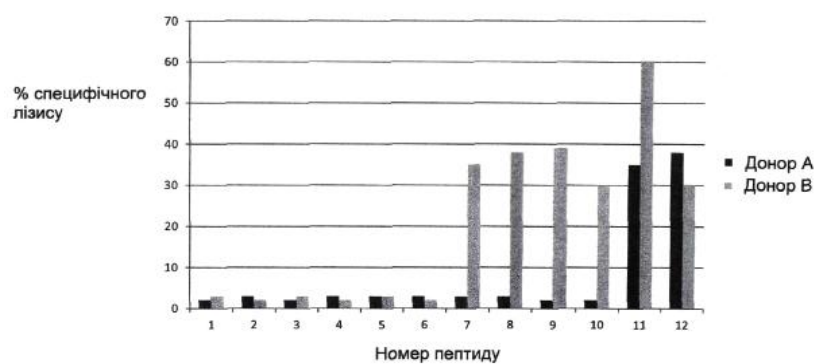
ФІГ. 14



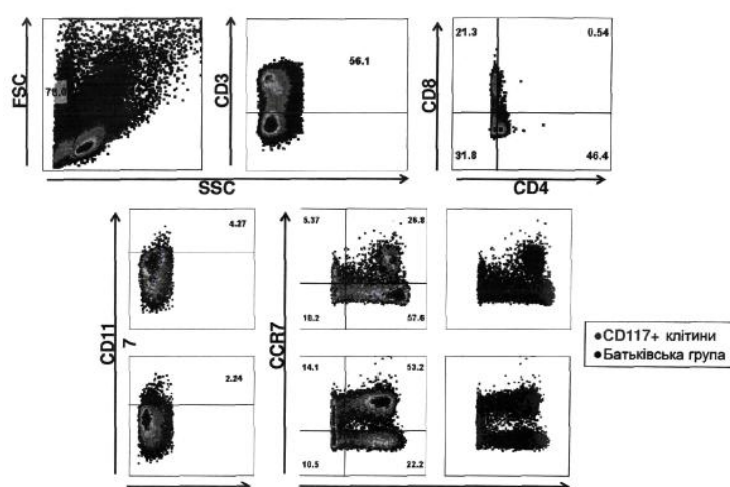
ФІГ. 15



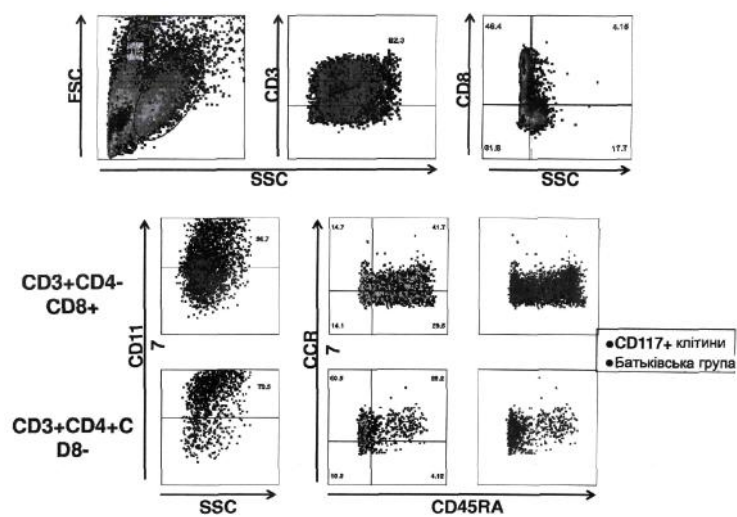
ФІГ. 16



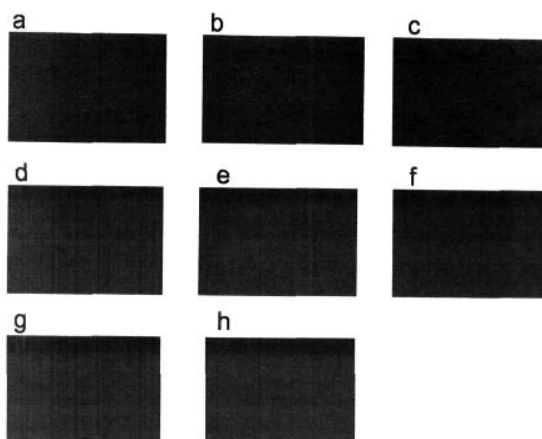
ФІГ. 17



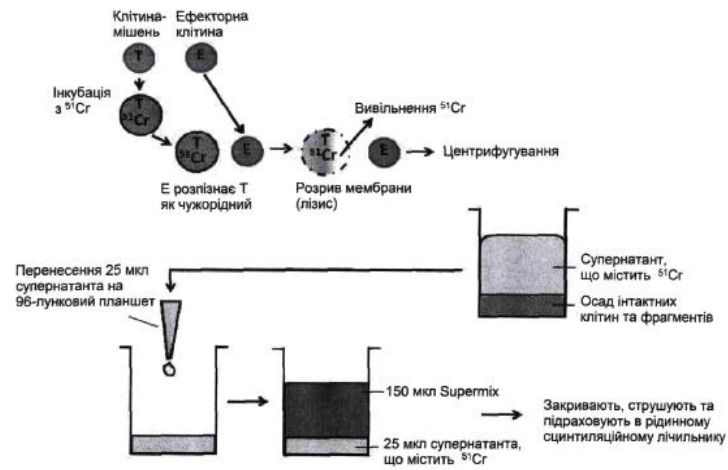
ФІГ. 18



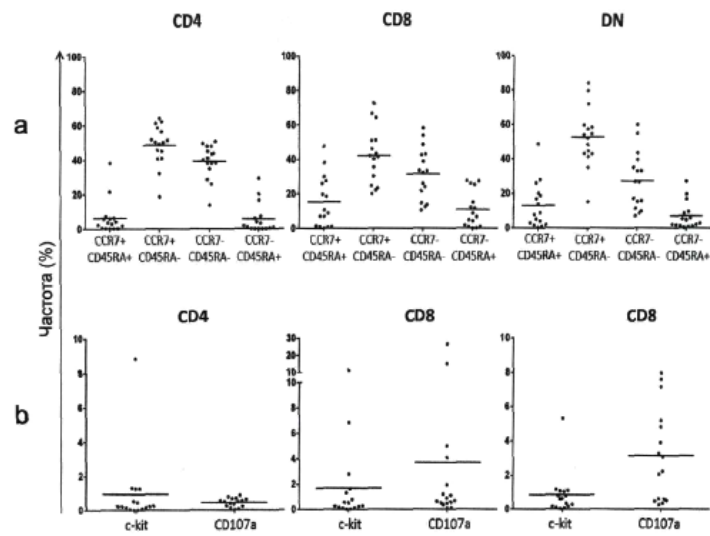
ФІГ. 19



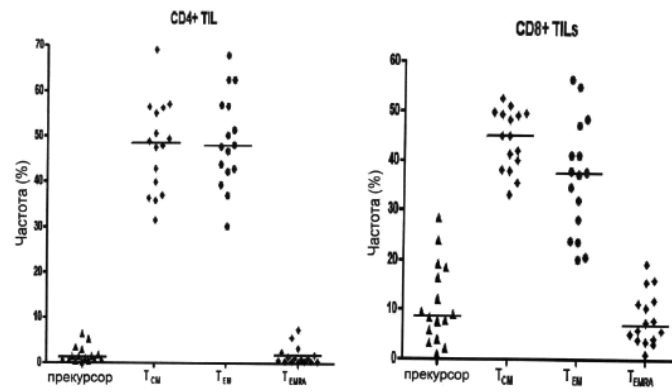
ФІГ. 20



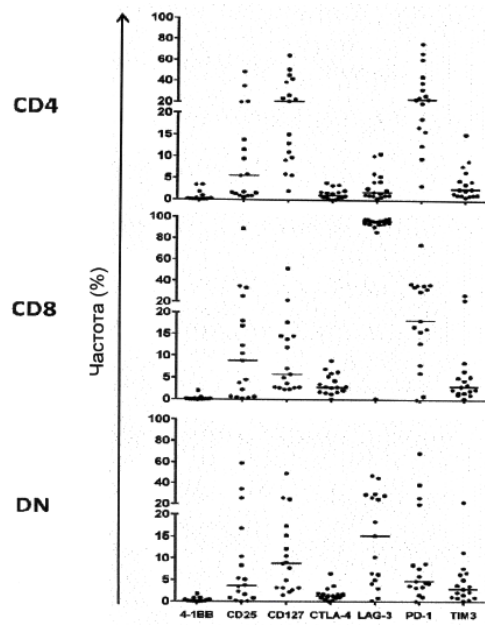
ФІГ. 21



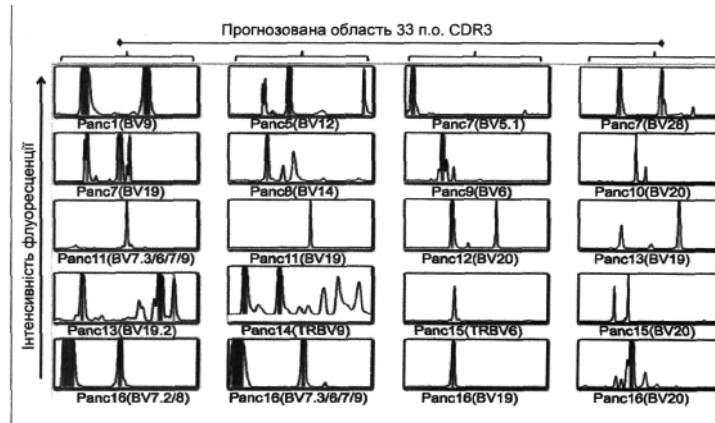
ФІГ. 22



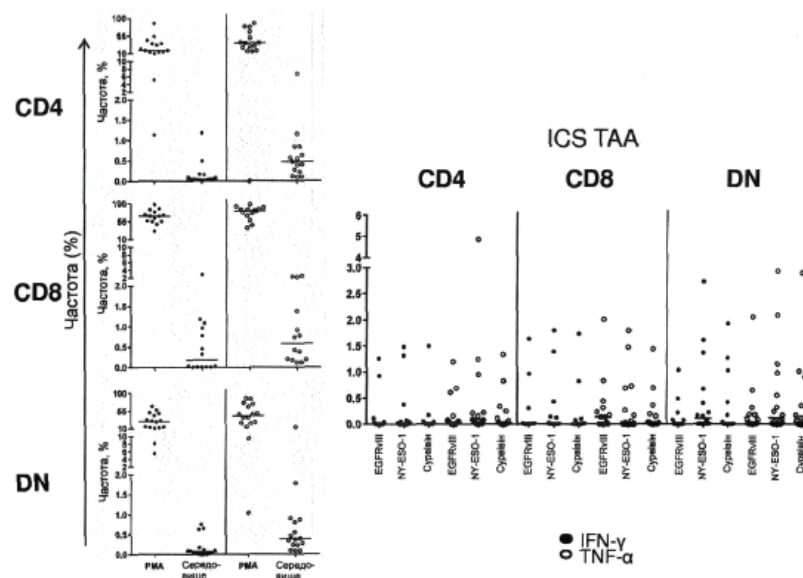
ФІГ. 23



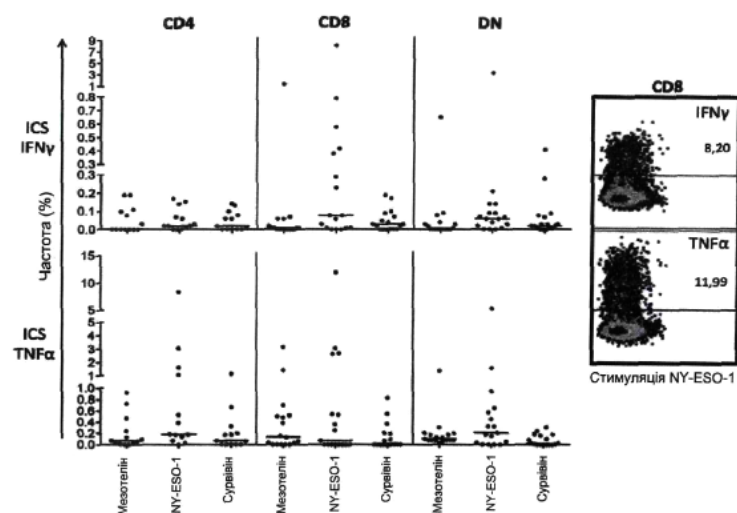
ФІГ. 24



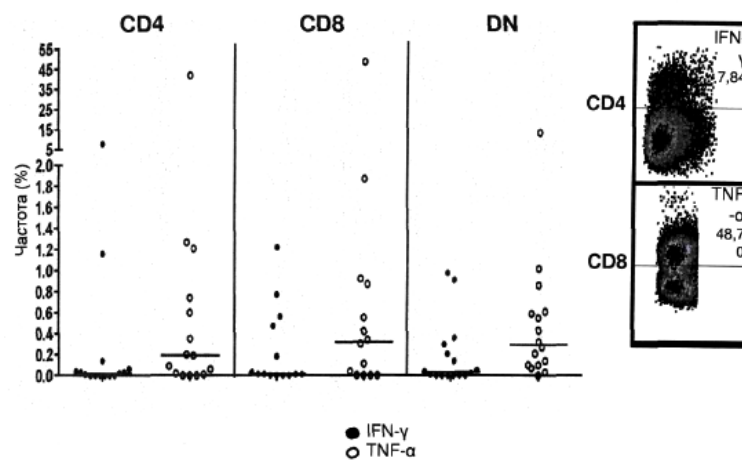
ФІГ. 25



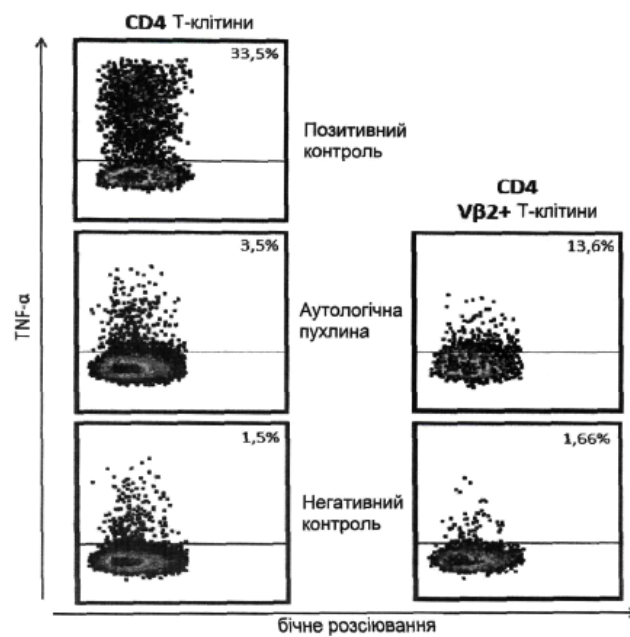
ФІГ. 26



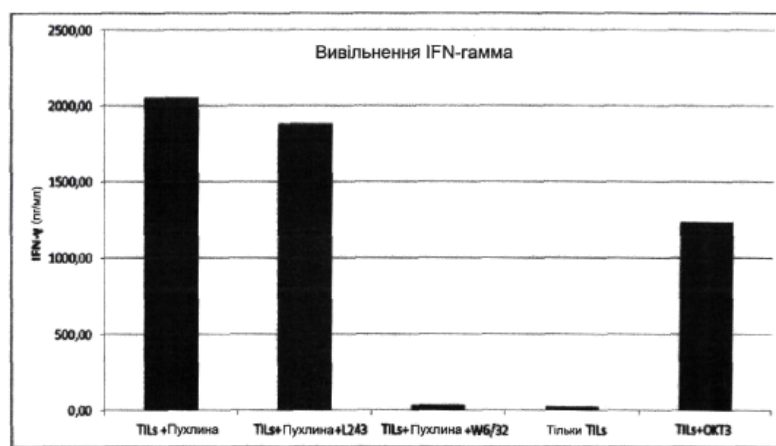
ФІГ. 27



ФІГ. 28

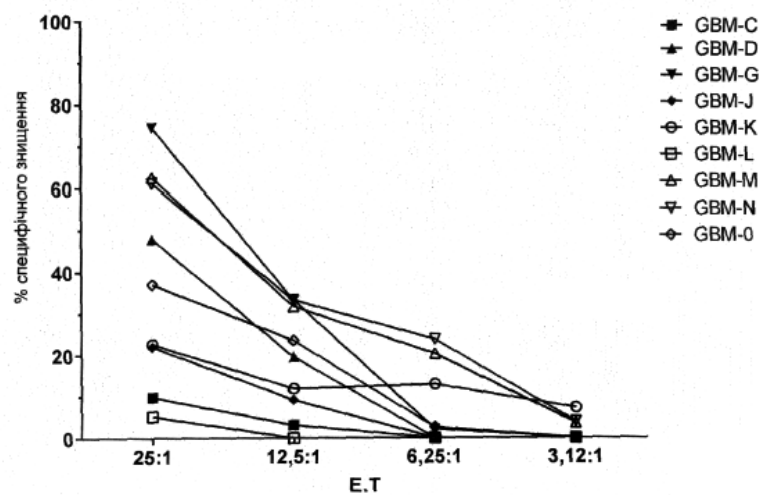


ФІГ. 29

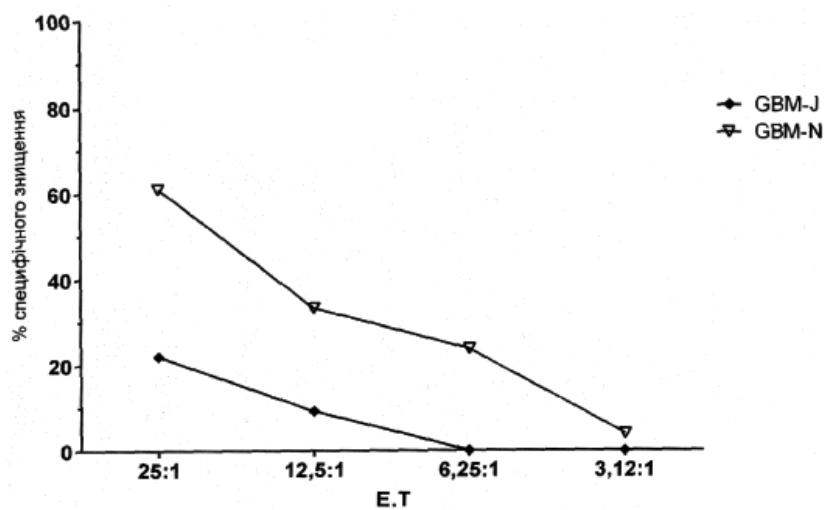


Panc 9 WBA-ELISA

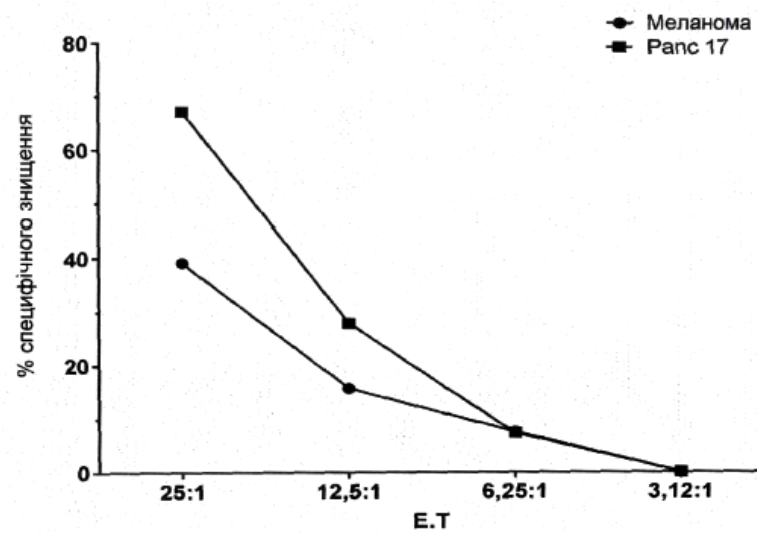
ФІГ. 30



ФІГ. 31



ФІГ. 32



ФІГ. 33