

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190649** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.19

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.03

(54) ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ С НМРЛ, РЕФРАКТЕРНЫХ К АНТИТЕЛУ К PD-1

(31) 62/725,976; 62/726,919

(72) Изобретатель:

(32) 2018.08.31; 2018.09.04

**Фардис Мария, Натараджан Арвинд
(US)**

(33) US

(86) PCT/US2019/049384

(74) Представитель:

(87) WO 2020/096682 2020.05.14

Медведев В.Н. (RU)

(88) 2020.06.25

(71) Заявитель:

**АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)**

(57) В настоящем изобретении предложены улучшенные и/или сокращенные процессы и способы получения TIL для получения терапевтических популяций TIL с повышенной терапевтической эффективностью для лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), причем НМРЛ является рефрактерным к лечению антителом к PD-1.

Процесс 2А: приблизительно 22 дня от стадии А до Е

1. ЭТАП А

Получение образца опухоли пациента

2. ЭТАП В

Фрагментация и первая экспансия

от 3 до 14 дней

3. ЭТАП С

Переход от первой экспансии ко второй экспансии

Без хранения и в закрытой системе

4. ЭТАП D

Вторая экспансия

IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки

Закрытая система

5. ЭТАП Е

Сбор TIL с этапа D

Закрытая система

6. ЭТАП F

Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии

(необязательная криоконсервация)

A1

202190649

202190649

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567722EA/026

ЛЕЧЕНИЕ ПАЦИЕНТОВ С НМРЛ, РЕФРАКТЕРНЫХ К АНТИТЕЛУ К PD-1 ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/725976, поданной 31 августа 2018 г., и предварительной заявки на патент США № 62/726919, поданной 4 сентября 2018 г., которые включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и настоящим включен посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 23 августа 2019 г., называется 116983-5043-WO_ST25.txt и имеет размер 168 килобайт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Лечение массивных, рефрактерных форм рака с использованием адоптивного переноса опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) является высокоэффективным подходом терапии для пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, et al., *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 383-393. Для успешной иммунотерапии требуется большое количество TIL, а для коммерческого применения необходим устойчивый и надежный процесс. Удовлетворение этой потребности было сложной задачей из-за технических, логистических и регуляторных проблем, связанных с экспансией клеток. Экспансия TIL на основе IL-2 с последующим «процессом быстрой экспансии» (REP) стала предпочтительным методом экспансии TIL из-за ее скорости и эффективности. Dudley, et al., *Science* **2002**, 298, 850-54; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346-57; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-39; Riddell, et al., *Science* **1992**, 257, 238-41; Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42. REP может обеспечить 1000-кратную экспансию TIL в течение 14-дневного периода, хотя для этого требуется большой избыток (например, 200-кратный) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК, также известных как мононуклеарные клетки (МНК)), часто от множества доноров, в качестве фидерных клеток, а также антитело к CD3 (ОКТ3) и высокие дозы IL-2. Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42. TIL, прошедшие процедуру REP, обеспечивали успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой. Текущие параметры приемлемости инфузии зависят от показателей состава TIL (например, положительности на CD28, CD8 или CD4), а также от кратности экспансии и жизнеспособности продукта REP.

[0004] Существующие процессы производства TIL и лечения с их помощью ограничены продолжительностью, стоимостью, вопросами стерильности и другими факторами, описанными в настоящем документе, так что возможность лечения пациентов, рефрактерных к антителу к PD1, как таковая была существенно ограничена. Существует острая потребность в обеспечении процессов производства TIL и способов лечения,

основанных на таких процессах, которые подходят для применения в лечении пациентов, для которых осталось очень мало или совсем не осталось подходящих вариантов лечения. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая сокращенный процесс производства для применения в наработке ТП, которые затем можно применять в лечении пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), рефрактерных к лечению антителом к PD-1.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В настоящем изобретении предложены улучшенные и/или сокращенные способы экспансии ТП и получения терапевтических популяций ТП для применения в лечении пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), рефрактерных к лечению антителом к PD-1.

[0006] В настоящем изобретении предложен способ лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с помощью популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИ), включающий следующие этапы:

(а) получение и/или прием первой популяции ТП с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии или других средств для получения образца, содержащего смесь опухолевых и ТП-клеток из опухоли НМРЛ у пациента, в том числе из множества фрагментов или биоптатов опухоли;

(с) приведение фрагментов опухоли в контакт с первой средой для культивирования клеток;

(d) проведение начальной экспансии указанной первой популяции ТП в указанной первой среде для культивирования клеток с получением второй популяции ТП, где указанная вторая популяция ТП по меньшей мере в 5 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТП, где указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(е) проведение быстрой экспансии указанной второй популяции ТП во второй среде для культивирования клеток с получением третьей популяции ТП, где указанная третья популяция ТП по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная вторая популяция ТП, через 7 дней после начала быстрой экспансии; где указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3) и необязательно облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК); и где быструю экспансию проводят в течение 14 дней или менее;

(f) сбор указанной третьей популяции ТП; и

(g) введение терапевтически эффективной части указанной третьей популяции ТП пациенту с НМРЛ;

где НМРЛ является рефрактерным к лечению антителом к PD-1.

[0007] В некоторых вариантах осуществления «получение» означает, что ТП, применяемые в способе и/или процессе, могут быть получены непосредственно из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) как части этапов способа

и/или процесса. В некоторых вариантах осуществления «прием» означает, что ТП, применяемые в способе и/или процессе, могут быть получены из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) опосредованно и затем применены в способе и/или процессе (например, когда этап (а) начинается с ТП, которые уже были выделены из образца с помощью отдельного процесса, не включенного в часть (а), такие ТП могут называться «принятыми»).

[0008] В некоторых вариантах осуществления получение первой популяции ТП включает метод взятия образцов из множества очагов поражения.

[0009] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к PD-L2.

[0010] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

[0011] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0012] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0013] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0014] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом.

[0015] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0016] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0017] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0018] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0019] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0020] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0021] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0022] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0023] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0024] В некоторых вариантах осуществления массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

[0025] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неоадьювантную или адьювантную терапии.

[0026] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

[0027] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

[0028] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу или его биоаналогу.

[0029] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

[0030] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

[0031] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

[0032] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

[0033] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к атезолизумабу или его биоаналогу.

[0034] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

[0035] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в

течение 21 дня или менее.

[0036] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

[0037] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

[0038] В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в первой среде для культивирования клеток.

[0039] В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток.

[0040] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[0041] В некоторых вариантах осуществления быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[0042] В некоторых вариантах осуществления первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ПЛ-4, ПЛ-7, ПЛ-15, ПЛ-21 и их комбинаций.

[0043] В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ПЛ-4, ПЛ-7, ПЛ-15, ПЛ-21 и их комбинаций.

[0044] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту третьей популяции ТП.

[0045] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе 60 мг/м²/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

[0046] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима ПЛ-2, начиная на следующий день после введения пациенту третьей популяции ТП.

[0047] В некоторых вариантах осуществления режим ПЛ-2 представляет собой высокодозовый режим ПЛ-2, включающий 600 000 или 720 000 МЕ/кг альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[0048] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с помощью популяции опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ТИЛ), включающий следующие этапы:

(а) резекцию одной или более опухолей у пациента, где указанные одна или более опухолей содержат первую популяцию ТП;

(b) измельчение указанных одной или более опухолей на фрагменты опухоли;
 (c) приведение фрагментов опухоли в контакт с первой средой для культивирования клеток;

(d) проведение начальной экспансии указанной первой популяции ТП в указанной первой среде для культивирования клеток с получением второй популяции ТП, где указанная вторая популяция ТП по меньшей мере в 5 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТП, где указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(e) проведение быстрой экспансии указанной второй популяции ТП во второй среде для культивирования клеток с получением третьей популяции ТП, где указанная третья популяция ТП по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная вторая популяция ТП, через 7 дней после начала быстрой экспансии; где указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3) и необязательно облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК); и где быструю экспансию проводят в течение 14 дней или менее;

(f) сбор указанной третьей популяции ТП; и

(g) введение терапевтически эффективной части указанной третьей популяции ТП пациенту с указанным раком;

где указанный рак является рефрактерным к лечению антителом к PD-1.

[0049] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

[0050] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

[0051] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0052] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0053] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0054] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом.

[0055] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0056] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0057] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не

подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0058] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0059] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0060] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0061] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0062] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0063] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[0064] В некоторых вариантах осуществления массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

[0065] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неоадьювантную или адьювантную терапии.

[0066] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

[0067] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

[0068] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу или его биоаналогу.

[0069] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

[0070] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является

рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

[0071] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

[0072] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

[0073] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к атезолизумабу или его биоаналогу.

[0074] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

[0075] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение 21 дня или менее.

[0076] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

[0077] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

[0078] В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в первой среде для культивирования клеток.

[0079] В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток.

[0080] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[0081] В некоторых вариантах осуществления быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[0082] В некоторых вариантах осуществления первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

[0083] В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

[0084] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту третьей популяции ТП.

[0085] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

[0086] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима ИЛ-2, начиная на следующий день после

введения пациенту третьей популяции ТП.

[0087] В некоторых вариантах осуществления режим П-2 представляет собой высокодозовый режим П-2, включающий 600 000 или 720 000 МЕ/кг альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

[0088] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложен способ лечения субъекта с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), где указанный рак является рефрактерным к лечению антителом к PD-1, где способ включает введение подвергнутых экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИ), включая:

(a) получение и/или прием первой популяции ТП из одной или более опухолей, резецированных у субъекта, путем обработки указанных одной или более опухолей, полученных от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) проведение первой экспансии путем культивирования указанной первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей П-2, с получением второй популяции ТП, где первую экспансию проводят в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, где первую экспансию проводят в течение приблизительно ~~3-11~~³⁻¹⁴ дней с получением указанной второй популяции ТП, где указанная вторая популяция ТП по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТП, и где переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) проведение второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции ТП добавок П-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (АПК) с получением третьей популяции ТП, где вторую экспансию проводят в течение приблизительно ~~7-11~~⁷⁻¹⁴ дней с получением указанной третьей популяции ТП, где указанная третья популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти по сравнению с указанной второй популяцией ТП, где вторую экспансию проводят в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и где переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(e) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на этапе (d), где переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции ТП с этапа (e) в пакет для инфузии, где переход от этапа (e) к (f) происходит без открытия системы;

(g) криоконсервацию пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию ТП с этапа (f), с использованием процесса криоконсервации; и

(h) введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки указанной третьей популяции ТП из пакета для инфузии с этапа (g).

[0089] В некоторых вариантах осуществления «получение» означает, что ТП,

используемые в способе и/или процессе, могут быть получены непосредственно из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) как части этапов способа и/или процесса. В некоторых вариантах осуществления «прием» означает, что ТП, используемые в способе и/или процессе, могут быть получены из образца (в том числе полученного с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии, или другого образца) опосредованно и затем использованы в способе и/или процессе (например, когда этап (а) начинается с ТП, которые уже были выделены из образца с помощью отдельного процесса, не включенного в часть (а), такие ТП могут называться «принятыми»).

[0090] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

[0091] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

[0092] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0093] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0094] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

[0095] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом.

[0096] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0097] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0098] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[0099] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[00100] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

[00101] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным

поражением на исходном уровне.

[00102] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[00103] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[00104] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

[00105] В некоторых вариантах осуществления массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

[00106] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неоадьювантную или адьювантную терапии.

[00107] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

[00108] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

[00109] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу или его биоаналогу.

[00110] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

[00111] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

[00112] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

[00113] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

[00114] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к атезолизумабу или его биоаналогу.

[00115] В некоторых вариантах осуществления рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

[00116] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение 21 дня или менее.

[00117] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

[00118] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение приблизительно 3-11 дней, а вторую экспансию проводят в течение приблизительно 7-11 дней.

[00119] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

[00120] В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в первой среде для культивирования клеток.

[00121] В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток.

[00122] В некоторых вариантах осуществления начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[00123] В некоторых вариантах осуществления быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

[00124] В некоторых вариантах осуществления первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ПЛ-4, ПЛ-7, ПЛ-15, ПЛ-21 и их комбинаций.

[00125] В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ПЛ-4, ПЛ-7, ПЛ-15, ПЛ-21 и их комбинаций.

[00126] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту третьей популяции ТП.

[00127] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

[00128] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с использованием режима ПЛ-2, начиная на следующий день после введения пациенту третьей популяции ТП.

[00129] В некоторых вариантах осуществления режим ПЛ-2 представляет собой высокодозовый режим ПЛ-2, включающий 600 000 или 720 000 МЕ/кг альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00130] **Фиг. 1:** иллюстративная диаграмма процесса 2А, где приведен обзор этапов с А по F.

[00131] **Фиг. 2:** блок-схема процесса 2А.

[00132] **Фиг. 3:** демонстрирует диаграмму варианта осуществления иллюстративного процесса производства криоконсервированных ТП (~22 дня).

[00133] **Фиг. 4:** демонстрирует диаграмму варианта осуществления процесса 2А, 22-дневного процесса производства ТП.

[00134] **Фиг. 5:** сравнительная таблица этапов с А по F иллюстративных вариантов осуществления процесса 1С и процесса 2А.

[00135] **Фиг. 6.** подробное сравнение варианта осуществления процесса 1С и варианта осуществления процесса 2А.

[00136] **Фиг. 7:** блок-схемы исследования для комбинированных когорт: когорты 1А (ММ), когорты 2А (ПКРГШ) и когорты 3А (НМРЛ). Сокращения: Су=циклофосфамид; ЕОА=конец оценки; ЕОС=конец исследования; ЕОТ=конец лечения; Flu=флударабин; ИЛ-2=интерлейкин 2; NMA-LD=немиелоаблативная лимфодеплеция; 1 р/3 нед=один раз в 3 недели; ТП=опухоль-инфильтрирующие лимфоциты. Пациенты в когортах 1А, 2А и 3А получают однократную инфузию пембролизумаба после завершения резецирования их опухоли для получения ТП и сканирования на исходном уровне до начала режима NMA-LD. В данном конкретном исследовании следующую дозу пембролизумаба вводили не ранее, чем после завершения курса ИЛ-2, и продолжали 1 р/3 нед ± 3 дня после этого в течение ≤ 2 лет (24 месяцев) или до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности, в зависимости от того, что происходило раньше.

[00137] **Фиг. 8:** блок-схема исследования для когорты, получавшей один агент: когорты 3В (НМРЛ). Сокращения: Су=циклофосфамид; ЕОА=конец оценки; ЕОС=конец исследования; ЕОТ=конец лечения; Flu=флударабин; ИЛ-2=интерлейкин 2; NMA-LD=немиелоаблативная лимфодеплеция; ТП=опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

[00138] **Фиг. 9:** демонстрирует диаграмму варианта осуществления процесса 2А, 22-дневного процесса производства ТП.

[00139] **Фиг. 10:** демонстрирует структуры I-A и I-B, цилиндры относятся к отдельным связывающим доменам полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных связывающих TNFRSF домена, полученных, например, из 4-1BBL или антитела, связывающего 4-1BB, которые сворачиваются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc (включая домены CH3 и CH2), который используется для связывания вместе двух трехвалентных белков посредством дисульфидных связей (небольшие удлиненные овалы), что стабилизирует структуру и обеспечивает агонисты, способные объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием сигнального комплекса. Связывающие TNFRSF домены, обозначенные цилиндрами, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, цепь VH и VL, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и

последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00140] SEQ ID NO:1 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи муромонаба.

[00141] SEQ ID NO:2 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи муромонаба.

[00142] SEQ ID NO:3 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-2.

[00143] SEQ ID NO:4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

[00144] SEQ ID NO:5 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-4.

[00145] SEQ ID NO:6 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-7.

[00146] SEQ ID NO:7 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-15.

[00147] SEQ ID NO:8 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-21.

[00148] SEQ ID NO:9 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого 4-1BB.

[00149] SEQ ID NO:10 представляет собой аминокислотную последовательность мышинового 4-1BB.

[00150] SEQ ID NO:11 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00151] SEQ ID NO:12 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00152] SEQ ID NO:13 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00153] SEQ ID NO:14 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00154] SEQ ID NO:15 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00155] SEQ ID NO:16 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00156] SEQ ID NO:17 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00157] SEQ ID NO:18 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00158] SEQ ID NO:19 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00159] SEQ ID NO:20 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00160] SEQ ID NO:21 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00161] SEQ ID NO:22 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00162] SEQ ID NO:23 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00163] SEQ ID NO:24 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00164] SEQ ID NO:25 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00165] SEQ ID NO:26 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00166] SEQ ID NO:27 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00167] SEQ ID NO:28 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00168] SEQ ID NO:29 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00169] SEQ ID NO:30 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00170] SEQ ID NO:31 представляет собой Fc-домен слитого белка-агониста TNFRSF.

[00171] SEQ ID NO:32 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00172] SEQ ID NO:33 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00173] SEQ ID NO:34 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00174] SEQ ID NO:35 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00175] SEQ ID NO:36 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00176] SEQ ID NO:37 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00177] SEQ ID NO:38 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00178] SEQ ID NO:39 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00179] SEQ ID NO:40 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00180] SEQ ID NO:41 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00181] SEQ ID NO:42 представляет собой Fc-домен слитого белка-агониста TNFRSF.

[00182] SEQ ID NO:43 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00183] SEQ ID NO:44 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00184] SEQ ID NO:45 представляет собой линкер слитого белка-агониста TNFRSF.

[00185] SEQ ID NO:46 представляет собой аминокислотную последовательность

лиганда 4-1BB (4-1BBL).

[00186] SEQ ID NO:47 представляет собой растворимую часть полипептида 4-1BBL.

[00187] SEQ ID NO:48 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

[00188] SEQ ID NO:49 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 1.

[00189] SEQ ID NO:50 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

[00190] SEQ ID NO:51 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) антитела-агониста 4-1BB 4B4-1-1 версии 2.

[00191] SEQ ID NO:52 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела-агониста 4-1BB H39E3-2.

[00192] SEQ ID NO:53 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) антитела-агониста 4-1BB H39E3-2.

[00193] SEQ ID NO:54 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого OX40.

[00194] SEQ ID NO:55 представляет собой аминокислотную последовательность мышиноного OX40.

[00195] SEQ ID NO:56 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00196] SEQ ID NO:57 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00197] SEQ ID NO:58 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00198] SEQ ID NO:59 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00199] SEQ ID NO:60 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00200] SEQ ID NO:61 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00201] SEQ ID NO:62 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00202] SEQ ID NO:63 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00203] SEQ ID NO:64 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00204] SEQ ID NO:65 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00205] SEQ ID NO:66 представляет собой тяжелую цепь моноклонального

антитела-агониста OX40 11D4.

[00206] SEQ ID NO:67 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00207] SEQ ID NO:68 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00208] SEQ ID NO:69 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00209] SEQ ID NO:70 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00210] SEQ ID NO:71 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00211] SEQ ID NO:72 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00212] SEQ ID NO:73 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00213] SEQ ID NO:74 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00214] SEQ ID NO:75 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 11D4.

[00215] SEQ ID NO:76 представляет собой тяжелую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00216] SEQ ID NO:77 представляет собой легкую цепь моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00217] SEQ ID NO:78 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00218] SEQ ID NO:79 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00219] SEQ ID NO:80 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00220] SEQ ID NO:81 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00221] SEQ ID NO:82 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00222] SEQ ID NO:83 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00223] SEQ ID NO:84 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00224] SEQ ID NO:85 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 18D8.

[00225] SEQ ID NO:86 представляет собой переменную область тяжелой цепи

(VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00226] SEQ ID NO:87 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00227] SEQ ID NO:88 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00228] SEQ ID NO:89 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00229] SEQ ID NO:90 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00230] SEQ ID NO:91 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00231] SEQ ID NO:92 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00232] SEQ ID NO:93 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu119-122.

[00233] SEQ ID NO:94 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00234] SEQ ID NO:95 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00235] SEQ ID NO:96 представляет собой CDR1 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00236] SEQ ID NO:97 представляет собой CDR2 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00237] SEQ ID NO:98 представляет собой CDR3 тяжелой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00238] SEQ ID NO:99 представляет собой CDR1 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00239] SEQ ID NO:100 представляет собой CDR2 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00240] SEQ ID NO:101 представляет собой CDR3 легкой цепи для моноклонального антитела-агониста OX40 Hu106-222.

[00241] SEQ ID NO:102 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда OX40 (OX40L).

[00242] SEQ ID NO:103 представляет собой растворимую часть полипептида OX40L.

[00243] SEQ ID NO:104 представляет собой альтернативную растворимую часть полипептида OX40L.

[00244] SEQ ID NO:105 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) для моноклонального антитела-агониста OX40 008.

[00245] SEQ ID NO:106 представляет собой переменную область легкой цепи

(VL) для моноклонального антитела-агониста OX40.

[00266] SEQ ID NO:127 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00267] SEQ ID NO:128 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00268] SEQ ID NO:129 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00269] SEQ ID NO:130 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00270] SEQ ID NO:131 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00271] SEQ ID NO:132 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00272] SEQ ID NO:133 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00273] SEQ ID NO:134 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00274] SEQ ID NO:135 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00275] SEQ ID NO:136 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи ингибитора PD-1 ниволумаба.

[00276] SEQ ID NO:137 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00277] SEQ ID NO:138 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00278] SEQ ID NO:139 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00279] SEQ ID NO:140 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00280] SEQ ID NO:141 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00281] SEQ ID NO:142 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00282] SEQ ID NO:143 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00283] SEQ ID NO:144 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00284] SEQ ID NO:145 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00285] SEQ ID NO:146 представляет собой аминокислотную последовательность

CDR3 легкой цепи ингибитора PD-1 пембролизумаба.

[00286] SEQ ID NO:147 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00287] SEQ ID NO:148 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00288] SEQ ID NO:149 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00289] SEQ ID NO:150 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00290] SEQ ID NO:151 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00291] SEQ ID NO:152 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00292] SEQ ID NO:153 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00293] SEQ ID NO:154 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00294] SEQ ID NO:155 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00295] SEQ ID NO:156 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи ингибитора PD-L1 дурвалумаба.

[00296] SEQ ID NO:157 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00297] SEQ ID NO:158 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00298] SEQ ID NO:159 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00299] SEQ ID NO:160 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00300] SEQ ID NO:161 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00301] SEQ ID NO:162 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00302] SEQ ID NO:163 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00303] SEQ ID NO:164 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00304] SEQ ID NO:165 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00305] SEQ ID NO:166 представляет собой аминокислотную последовательность

CDR3 легкой цепи ингибитора PD-L1 авелумаба.

[00306] SEQ ID NO:167 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00307] SEQ ID NO:168 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00308] SEQ ID NO:169 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00309] SEQ ID NO:170 представляет собой аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00310] SEQ ID NO:171 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00311] SEQ ID NO:172 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00312] SEQ ID NO:173 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00313] SEQ ID NO:174 представляет собой аминокислотную последовательность CDR1 легкой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00314] SEQ ID NO:175 представляет собой аминокислотную последовательность CDR2 легкой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

[00315] SEQ ID NO:176 представляет собой аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи ингибитора PD-L1 атезолизумаба.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[00316] Адоптивная клеточная терапия с использованием ТП, культивируемых *ex vivo* по протоколу быстрой экспансии (REP), обеспечила успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии хозяина у пациентов с раком, таким как меланома. Текущие параметры приемлемости инфузии зависят от показателей состава ТП (например, положительности на CD28, CD8 или CD4), а также от численных кратностей экспансии и жизнеспособности продукта REP.

[00317] Текущие протоколы REP дают мало информации о состоянии здоровья ТП, которые будут введены пациенту. Т-клетки претерпевают значительный метаболический сдвиг в процессе своего созревания от наивных до эффекторных Т-клеток (см. источник Chang, et al., Nat. Immunol. **2016**, 17, 364, настоящим явным образом включенный в полном объеме, и, в частности, в части обсуждения и маркеров анаэробного и аэробного метаболизма). Например, наивные Т-клетки полагаются на митохондриальное дыхание для производства АТФ, в то время как зрелые здоровые эффекторные Т-клетки, такие как ТП, обладают высокой гликолитической способностью, полагаясь на аэробный гликолиз для обеспечения биоэнергетических субстратов, необходимых им для пролиферации, миграции, активации и противоопухолевого действия.

[00318] Существующие процессы производства ТП и лечения с их помощью

ограничены продолжительностью, стоимостью, вопросами стерильности и другими факторами, описанными в настоящем документе, так что возможность лечения пациентов, рефрактерных к антителам к PD1, как таковая была существенно ограничена. Существует острая потребность в обеспечении процессов производства ТП и способов лечения, основанных на таких процессах, которые подходят для использования в лечении пациентов, для которых осталось очень мало или совсем не осталось подходящих вариантов лечения. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая сокращенный процесс производства для применения для получения ТП, которые затем могут быть использованы в лечении пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), рефрактерных к лечению антителом к PD-1.

Определения

[00319] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понимаемое специалистом в области техники, к которой относится данное изобретение. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме.

[00320] Термины «совместное введение», «совместно вводить», «вводимый в комбинации с», «введение в комбинации с», «одновременное» и «параллельное» в контексте настоящего документа охватывают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, множества ТП) субъекту так, чтобы как активные фармацевтические ингредиенты, так и/или их метаболиты присутствовали в организме субъекта в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в разное время в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Одновременное введение в отдельных композициях и введение в композиции, в которой присутствуют оба агента, являются предпочтительными.

[00321] Термин «*in vivo*» относится к явлению, которое происходит в организме субъекта.

[00322] Термин «*in vitro*» относится к явлению, которое происходит вне организма субъекта. Анализы *in vitro* охватывают анализы на клетках, в которых используются живые или мертвые клетки, и могут также включать бесклеточный анализ, в котором не используются интактные клетки.

[00323] Термин «*ex vivo*» относится к явлению, которое включает лечение или проведение процедуры на клетке, ткани и/или органе, которые были взяты из организма субъекта. Клетка, ткань и/или орган могут быть надлежащим образом возвращены в организм субъекта в процессе хирургического вмешательства или лечения.

[00324] Термин «быстрая экспансия» означает увеличение количества антигенспецифических ТП по меньшей мере приблизительно в 3 раза (или 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) за неделю, более предпочтительно по меньшей мере приблизительно в 10 раз (или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) за неделю или, наиболее предпочтительно, по меньшей

мере приблизительно в 100 раз за неделю. В настоящем документе описан ряд протоколов быстрой экспансии.

[00325]

[00326] Под «опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами» или «ТП» в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных телец, которые покинули кровотока субъекта и мигрировали в опухоль. ТП включают, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 $CD4^+$ Т-клетки, естественных киллеров, дендритные клетки и макрофаги M1. ТП включают как первичные, так и вторичные ТП. «Первичные ТП» - это ТП, полученные из образцов ткани пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежесобранными»), а «вторичные ТП» - это любые популяции ТП-клеток, которые были подвергнуты экспансии или пролиферации, как обсуждается в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, общие популяции ТП и подвергнутые экспансии ТП («REP ТП» или «ТП после REP»). Популяции ТП-клеток могут включать генетически модифицированные ТП.

[00327] Под «популяцией клеток» (включая ТП) в настоящем документе подразумевается ряд клеток, которые имеют общие признаки. Как правило, численность популяций обычно колеблется от 1×10^6 до 1×10^{10} , при этом разные популяции ТП имеют разную численность. Например, начальный рост первичных ТП в присутствии IL-2 приводит к популяции общей массы ТП численностью приблизительно 1×10^8 клеток. Экспансию REP обычно проводят для получения популяций из от $1,5 \times 10^9$ до $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

[00328] Под «криоконсервированными ТП» в настоящем документе подразумевается, что ТП, будь то первичные, общие или подвергнутые экспансии (REP ТП), обрабатывают и хранят в диапазоне от -150°C до -60°C . Общие методы криоконсервации также описаны в других местах настоящего документа, в том числе в разделе примеров. Для ясности, «криоконсервированные ТП» отличаются от замороженных образцов ткани, которые могут быть использованы в качестве источника первичных ТП.

[00329] Под «размороженными криоконсервированными ТП» в настоящем документе подразумевается популяция ТП, которые ранее были криоконсервированы, а затем обработаны для возврата к комнатной или более высокой температуре, включая, не ограничиваясь перечисленным, температуры культивирования клеток или температуры, при которых ТП можно вводить пациенту.

[00330] ТП обычно могут быть определены биохимическими методами, с использованием маркеров клеточной поверхности, или функционально, по их способности инфильтрировать опухоли и осуществлять лечение. ТП обычно могут быть распределены по категориям по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и в качестве альтернативы, ТП могут быть функционально определены по их способности

инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту.

[00331] Термин «среды для криоконсервации» или «среда для криоконсервации» относится к любой среде, которая может быть использована для криоконсервации клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие от 7% до 10% ДМСО (диметилсульфоксида). Примеры сред включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их комбинации. Термин «CS10» относится к среде для криоконсервации, полученной от Stemcell Technologies или от Biolife Solutions. Среда CS10 может упоминаться под торговым наименованием «CryoStor® CS10». Среда CS10 представляет собой среду без сыворотки и животных компонентов, содержащую ДМСО.

[00332] Термин «Т-клетки центральной памяти» относится к подмножеству Т-клеток, которые у человека являются CD45R0+ и конститутивно экспрессируют CCR7 (CCR7^{hi}) и CD62L (CD62^{hi}). Поверхностный фенотип Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции Т-клеток центральной памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMI1. Т-клетки центральной памяти главным образом секретируют IL-2 и CD40L в качестве эффекторных молекул после стимуляции TCR. Т-клетки центральной памяти преобладают в компартменте CD4 крови, а у человека их концентрация пропорционально повышена в лимфатических узлах и миндалинах.

[00333] Термин «эффекторные Т-клетки памяти» относится к подмножеству Т-клеток человека или млекопитающих, которые, подобно Т-клеткам центральной памяти, являются CD45R0+, но утратили конститутивную экспрессию CCR7 (CCR7^{lo}) и являются гетерогенными или низкими по экспрессии CD62L (CD62L^{lo}). Поверхностный фенотип Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции Т-клеток центральной памяти включают BLIMP1. Эффекторные Т-клетки памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, включая интерферон-γ, IL-4 и IL-5. Эффекторные Т-клетки памяти преобладают в компартменте CD8 крови, а у человека их концентрация пропорционально повышена в легких, печени и кишечнике. CD8+ эффекторные Т-клетки памяти несут большие количества перфорина.

[00334] Термин «закрытая система» относится к системе, закрытой для внешней среды. Любая закрытая система, подходящая для способов культивирования клеток, может быть использована для способов согласно настоящему изобретению. Закрытые системы включают, например, закрытые G-контейнеры, но не ограничиваются ими. После добавления сегмента опухоли в закрытую систему ее не открывают для внешней среды до тех пор, пока TIL не будут готовы для введения пациенту.

[00335] Термины «фрагментирование», «фрагмент» и «фрагментированный», используемые в настоящем документе для описания процессов разрушения опухоли, включают методы механической фрагментации, такие как дробление, разрезание, деление и кускование опухолевой ткани, а также любой другой метод разрушения физической структуры опухолевой ткани.

[00336] Термины «моноклеарные клетки периферической крови» и «МНПК» относятся к клетке периферической крови, имеющей круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки) и моноциты. Предпочтительно моноклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови. МНПК представляют собой тип антигенпрезентирующих клеток.

[00337] Термин «антитело к CD3» относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Антитела к CD3 включают ОКТ-3, также известное как муромонаб. Антитела к CD3 также включают клон УНСТ1, также известный как Т3 и CD3ε. Другие антитела к CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

[00338] Термин «ОКТ-3» (также упоминаемый в настоящем документе как «ОКТ3») относится к моноклональному антителу или его биоаналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, направленные против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) и муромонаб, или их варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или биоаналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур под регистрационным номером ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) под номером по каталогу 86022706.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотные последовательности муромонаба.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:1 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTTY 60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA 120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL 180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300

	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAN 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNMFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00339] Термин «IL-2» (также называемый в настоящем документе «IL2») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин 2, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-2 описан, например, в источниках Nelson, J. Immunol. **2004**, 172, 3983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. **2008**, 26, 453-79, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-2, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:3). Например, термин IL-2 охватывает человеческие рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (PROLEUKIN, коммерчески доступен от нескольких поставщиков в одноразовых флаконах с 22 миллионами МЕ на флакон), а также форму рекомбинантного IL-2, поставляемого на рынок компанией CellGenix, Inc., Портсмут, Нью-Гэмпшир, США (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист Брунсуик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-209-b), и другие коммерческие эквиваленты от других поставщиков. Альдеслейкин (дез-аланил-1, серин-125, человеческий IL-2) представляет собой негликозилированную человеческую рекомбинантную форму IL-2 с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:4). Термин IL-2 также охватывает пэгиллированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пролекарство пэгиллированного IL2 NKTR-214, доступное от Nektar Therapeutics, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США. NKTR-214 и пэгиллированный IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в публикации заявки на патент США US 2014/0328791 A1 и публикации международной патентной заявки WO 2012/065086 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502,

содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Препараты IL-2, подходящие для применения в изобретении, описаны в патенте США № 6706289, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

ТАБЛИЦА 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:3 рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKPYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGS TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLTKI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 рекомбинантный человеческий IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 рекомбинантный человеческий IL-21	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120

(rhIL-21)

HLSSRTHGSE DS 132

[00340] Термин «IL-4» (также называемый в настоящем документе «IL4») относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Th2 Т-клетками и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Th2 Т-клетки. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001**, 2, 66-70. После активации IL-4 Th2 Т-клетки впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II, и вызывает переключение класса на экспрессию IgE и IgG₁ из В-клеток. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для применения в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, № по каталогу Gibco STR0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:5).

[00341] Термин «IL-7» (также называемый в настоящем документе «IL7») относится к гликозилированному тканевому цитокину, известному как интерлейкин 7, который может быть получен из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, *Blood* **2002**, 99, 3892-904. IL-7 может стимулировать развитие Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором IL-7, гетеродимером, состоящим из альфа-цепи рецептора IL-7 и общей гамма-цепи рецептора, что приводит к серии сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для применения в изобретении, коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, № по каталогу Gibco PNC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:6).

[00342] Термин «IL-15» (также называемый в настоящем документе «IL15») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин 15, и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-15 описан, например, в источнике Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001**, 97, 14-32, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-15 имеет общие субъединицы β и γ сигнального рецептора с IL-2. Рекомбинантный человеческий IL-15 представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-15 коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсвик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу CYT-230-b) и

ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-15, № по каталогу 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-15, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:7).

[00343] Термин «IL-21» (также называемый в настоящем документе «IL21») относится к белку плеiotропного цитокина, известному как интерлейкин 21, и включает все формы IL-21, включая формы человека и млекопитающих, их консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги и варианты. IL-21 описан, например, в источнике Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. **2014**, 13, 379-95, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется естественными киллерными Т-клетками и активированными человеческими CD4⁺ Т-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-21 представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-21 коммерчески доступен от нескольких поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брунсуик, Нью-Джерси, США (№ по каталогу СУТ-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный человеческий белок IL-21, № по каталогу 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-21, подходящего для применения в изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:8).

[00344] Когда указано «эффективное противоопухолевое количество», «эффективное количество, ингибирующее опухоль» или «терапевтическое количество», точное количество композиций согласно настоящему изобретению для введения может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, степени инфекции или метастазирования и состояния пациента (субъекта). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (например, вторичные ТИЛ или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанная в настоящем документе, может быть введена в дозировке от 10^4 до 10^{11} клеток/кг массы тела (например, от 10^5 до 10^6 , от 10^5 до 10^{10} , от 10^5 до 10^{11} , от 10^6 до 10^{10} , от 10^6 до 10^{11} , от 10^7 до 10^{11} , от 10^7 до 10^{10} , от 10^8 до 10^{11} , от 10^8 до 10^{10} , от 10^9 до 10^{11} или от 10^9 до 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Композиции, содержащие опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (в том числе, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) также могут быть введены множество раз в этих дозировках. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (в том числе, в некоторых случаях, генетически модифицированные) могут быть введены с использованием методов инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Оптимальная дозировка и режим лечения для конкретного пациента могут быть легко определены специалистом в области медицины путем наблюдения за пациентом на предмет признаков заболевания и соответствующей корректировки лечения.

[00345] Термин «микроокружение» в контексте настоящего документа может относиться к микроокружению солидной или гематологической опухоли в целом или к отдельной подгруппе клеток в этом микроокружении. Микроокружение опухоли в контексте настоящего документа относится к сложной смеси «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических стимулов, которые способствуют неопластической трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, способствуют терапевтической резистентности и создают ниши для разрастания доминирующих метастазов», как описано в Swartz, et al., *Cancer Res.*, **2012**, 72, 2473. Несмотря на то, что опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, элиминация опухоли иммунной системой происходит редко из-за подавления иммунного ответа микроокружением.

[00346] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с помощью популяции ТП, в котором пациент предварительно получает немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией ТП согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления может быть предоставлена популяция ТП, где пациент предварительно получал лечение немиелоаблативной химиотерапией перед инфузией ТП согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией ТП) и флударабин 25 мг/м²/сут в течение 5 дней (дни с 27 по 23 перед инфузией ТП). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ТП (в день 0) согласно изобретению пациент получает внутривенную инфузию ИЛ-2 в дозе 720 000 МЕ/кг раз в 8 часов до достижения физиологической толерантности.

[00347] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция до адоптивного переноса опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемую «иммуносупрессивным кондиционированием») перед введением гТП согласно изобретению.

[00348] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству соединения или комбинации соединений, как описано в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления предполагаемого применения, включая, не ограничиваясь перечисленным, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*) или субъекта и патологического состояния, подлежащего лечению (например, массы тела, возраста и пола субъекта), тяжести патологического состояния или способа введения. Этот термин также относится к дозе, которая будет вызывать определенный ответ в клетках-мишенях (например, снижение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза

будет варьироваться в зависимости от конкретных выбранных соединений, режима дозирования, которого необходимо придерживаться, от того, вводится ли соединение в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую его вводят, и физической системы доставки, в которой переносится соединение.

[00349] Термины «лечение», «осуществление лечения», «лечить» и т. п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения от заболевания и/или нежелательного эффекта, связанного с заболеванием. «Лечение» в контексте настоящего документа охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (a) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к развитию заболевания, но у которого оно еще не было диагностировано; (b) подавление заболевания, т. е. остановку его развития или прогрессирования; и (c) облегчение заболевания, т. е. вызывание регресса заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания. «Лечение» также подразумевает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже при отсутствии заболевания или состояния. Например, «лечение» включает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или обеспечивать иммунитет в отсутствие патологического состояния, например, в случае вакцины.

[00350] Термин «гетерологичный» при использовании применительно к частям нуклеиновой кислоты или белка означает, что указанная нуклеиновая кислота или белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не находятся в таких же отношениях друг с другом в природе. Например, нуклеиновую кислоту обычно получают рекомбинантно, имея две или более последовательностей из неродственных генов, организованных для образования новой функциональной нуклеиновой кислоты, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника или кодирующие области из разных источников. Точно так же гетерологичный белок означает, что белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не находятся в таких же отношениях друг с другом в природе (например, слитый белок).

[00351] Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «99% идентичность») в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент одинаковых нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании (с введением гэпов, если это необходимо) для максимального соответствия, не учитывая какие-либо консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательностей. Процент идентичности может быть измерен с помощью программного обеспечения или алгоритмов для сравнения последовательностей, или путем визуальной проверки. В

данной области техники известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые могут быть использованы для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, пакет программ BLAST, доступный на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США. Сравнение двух последовательностей может быть осуществлено с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими общедоступными программами, которые можно использовать для выравнивания последовательностей, являются ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния) или MegAlign, доступный от DNASTAR. Специалист в данной области техники способен определить подходящие параметры для максимального выравнивания с помощью отдельно взятого программного обеспечения для выравнивания. В отдельных вариантах осуществления используются параметры программного обеспечения для выравнивания по умолчанию.

[00352] В контексте настоящего документа термин «вариант» охватывает, не ограничиваясь перечисленным, антитела или слитые белки, содержащие аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности референсного антитела посредством одной или более замен, делеций и/или добавлений в определенных положениях в аминокислотной последовательности референсного антитела или соседних с ними положениях. Вариант может содержать одну или более консервативных замен в своей аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью референсного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену схожим образом заряженных или незаряженных аминокислот. Вариант сохраняет способность специфически связываться с антигеном референсного антитела. Термин «вариант» также включает пэгилированные антитела или белки.

[00353] Под «опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами» или «ТИЛ» в настоящем документе подразумевается популяция клеток, первоначально полученных в виде белых кровяных телец, которые покинули кровоток субъекта и мигрировали в опухоль. ТИЛ включают, не ограничиваясь перечисленным, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 $CD4^+$ Т-клетки, естественных киллеров, дендритные клетки и макрофаги M1. ТИЛ включают как первичные, так и вторичные ТИЛ. «Первичные ТИЛ» - это ТИЛ, полученные из образцов ткани пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежесобранными»), а «вторичные ТИЛ» - это любые популяции ТИЛ-клеток, которые были подвергнуты экспансии или пролиферации, как обсуждается в настоящем документе, включая, не ограничиваясь перечисленным, общие популяции ТИЛ, подвергнутые экспансии ТИЛ («REP ТИЛ»), а также «reREP ТИЛ», как обсуждается в настоящем документе. reREP ТИЛ могут включать, например, ТИЛ второй экспансии или ТИЛ второй дополнительной экспансии (такие как, например, описанные на этапе D фиг. 8,

включая TIL, называемые геREP TIL).

[00354] TIL обычно могут быть определены биохимически, с использованием маркеров клеточной поверхности, или функционально, по их способности инфильтрировать опухоли и осуществлять лечение. TIL обычно могут быть распределены по категориям по экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и в качестве альтернативы, TIL могут быть функционально определены по их способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту. TIL могут дополнительно характеризоваться эффективностью - например, TIL могут считаться высокоэффективными, если, например, высвобождение интерферона (IFN γ) составляет более приблизительно 50 пг/мл, более приблизительно 100 пг/мл, более приблизительно 150 пг/мл или более приблизительно 200 пг/мл, более приблизительно 300 пг/мл, более приблизительно 400 пг/мл, более приблизительно 500 пг/мл, более приблизительно 600 пг/мл, более приблизительно 700 пг/мл, более приблизительно 800 пг/мл, более приблизительно 900 пг/мл, более приблизительно 1000 пг/мл.

[00355] Термин «дезоксирибонуклеотид» охватывает природные и синтетические, немодифицированные и модифицированные дезоксирибонуклеотиды. Модификации включают изменения сахарного фрагмента, основного фрагмента и/или связей между дезоксирибонуклеотидами в олигонуклеотиде.

[00356] Термин «РНК» означает молекулу, содержащую по меньшей мере один рибонуклеотидный остаток. Термин «рибонуклеотид» означает нуклеотид с гидроксильной группой в 2'-положении фрагмента b-D-рибофуранозы. Термин «РНК» включает двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, выделенную РНК, такую как частично очищенная РНК, по существу чистая РНК, синтетическая РНК, рекомбинантно полученная РНК, а также измененная РНК, которая отличается от природной РНК добавлением, делецией, заменой и/или изменением одного или более нуклеотидов. Нуклеотиды описанных в настоящем документе молекул РНК могут также включать нестандартные нуклеотиды, такие как не встречающиеся в природе нуклеотиды или химически синтезированные нуклеотиды или дезоксинуклеотиды. Эти измененные РНК могут называться аналогами или аналогами природной РНК.

[00357] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» подразумевают любые возможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и агенты, замедляющие всасывание, и инертные ингредиенты. Применение таких фармацевтически приемлемых носителей или фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда любой обычный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество несовместимы с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается их использование в терапевтических композициях согласно изобретению.

Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

[00358] Термины «приблизительно» и «примерно» означают в пределах статистически значимого диапазона значений. Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10% и даже более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое терминами «приблизительно» или «примерно», зависит от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области техники. Более того, в контексте настоящего документа термины «приблизительно» и «примерно» означают, что измерения, размеры, составы, параметры, формы и другие количества и характеристики не являются и не обязательно должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или быть больше или меньше, по желанию, отражая допуски, коэффициенты пересчета, округление, погрешность измерения и т. п., а также другие факторы, известные специалистам в данной области техники. Как правило, измерение, размер, состав, параметр, форма или другая величина или характеристика являются «приблизительными» или «примерными», независимо от того, указано ли это явным образом. Следует отметить, что описанные конструкции могут использоваться в вариантах осуществления очень разных размеров, форм и измерений.

[00359] Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» при использовании в прилагаемой формуле изобретения в исходной и измененной форме определяют объем пункта формулы изобретения в отношении того, какие неуказанные дополнительные элементы или этапы пункта формулы изобретения, если таковые имеются, исключены из объема пункта(ов) формулы изобретения. Термин «содержащий» рассматривается как включительный или неограничительный и не исключает каких-либо дополнительных, неперечисленных элементов, способов, этапов или материалов. Термин «состоящий из» исключает любой элемент, этап или материал, кроме указанных в пункте формулы изобретения, и, в последнем случае, примеси, обычно связанные с указанным материалом(ами). Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем пункта формулы изобретения указанными элементами, этапами или материалом(ами), а также теми элементами, которые существенно не влияют на основную(ые) и новую(ые) характеристику(и) заявленного изобретения. Все описанные в настоящем документе композиции, способы и наборы, которые воплощают настоящее изобретение, в альтернативных вариантах осуществления могут быть более конкретно определены любым из переходных терминов «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из».

[00360] Термины «антитело» и его множественное число «антитела» относятся к целым иммуноглобулинам и любому их антигенсвязывающему фрагменту («антигенсвязывающей части») или отдельным цепям. «Антитело» также относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L)

цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или его антигенсвязывающей части. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L антитела могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, которые называются определяющими комплементарность областями (CDR) или гипервариабельными областями (HVR), и которые могут перемежаться областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с эпитопом или эпитопами антигена. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[00361] Термин «антиген» относится к веществу, которое вызывает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой молекулу, способную быть связанной антителом или TCR при презентации молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC). Термин «антиген» в контексте настоящего документа также включает эпитопы Т-клеток. Антиген также может распознаваться иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления антиген способен вызывать гуморальный иммунный ответ или клеточный иммунный ответ, ведущий к активации В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов. В некоторых случаях для этого может быть необходимо, чтобы антиген содержал эпитоп Тh-клеток или был связан с ним. Антиген также может иметь один или более эпитопов (например, В- и Т-эпитопы). В некоторых вариантах осуществления антиген предпочтительно будет реагировать, обычно высокоспецифичным и селективным образом, с его соответствующим антителом или TCR, но не с множеством других антител или TCR, которые могут быть индуцированы другими антигенами.

[00362] Термины «моноклональное антитело», «mAb», «композиция моноклонального антитела» или их множественные числа относятся к препарату молекул антитела, имеющему один тип молекулы в составе. Композиция моноклонального антитела демонстрирует единственную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Моноклональные антитела, специфичные к определенным рецепторам, могут быть получены с использованием знаний и навыков в области инъекции испытуемым подходящего антигена и последующего выделения гибридом, экспрессирующих антитела, имеющие желаемую последовательность или функциональные характеристики. ДНК, кодирующая моноклональные антитела, легко

может быть выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Клетки гибридомы служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК может быть помещена в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или клетки миеломы, которые иначе не продуцируют белок иммуноглобулина, с обеспечением синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Рекомбинантное получение антител будет более подробно описано ниже.

[00363] Термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «часть» или «фрагмент антитела») в контексте настоящего документа относятся к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином «антигенсвязывающая часть» антитела, включают (i) фрагмент Fab - одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и $CH1$; (ii) фрагмент $F(ab')_2$ - двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и $CH1$; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент доменного антитела (dAb) (Ward, et al., *Nature*, **1989**, 341, 544-546), который может состоять из домена V_H или V_L ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Более того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены, с использованием рекомбинантных методов, с помощью синтетического линкера, который позволяет им быть полученными в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H объединяются в пару с образованием одновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird, et al., *Science* **1988**, 242, 423-426; и Huston, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, 85, 5879-5883). Подразумевается, что такие scFv-антитела также охватываются терминами «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Эти фрагменты антител получают с использованием обычных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

[00364] Подразумевается, что термин «человеческое антитело» в контексте настоящего документа включает антитела, имеющие переменные области, в которых как каркасная область, так и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, эта константная область также происходит из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела согласно изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые

последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Подразумевается, что термин «человеческое антитело» в контексте настоящего документа не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности.

[00365] Термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, проявляющим единственную специфичность связывания, которые имеют переменные области, в которых как каркасные области, так и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном из вариантов осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая включает В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

[00366] Термин «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего документа включает все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, такие как (a) антитела, выделенные от животного (такого как мышь), которое является трансгенным или трансхромосомным в отношении генов человеческих иммуноглобулинов, или полученной из него гибридомы (дополнительно описанной ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии человеческого антитела, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими методами, которые включают сплайсинг последовательностей гена человеческого иммуноглобулина с получением других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела имеют переменные области, в которых каркасные области и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела могут быть подвергнуты мутагенезу *in vitro* (или, когда используются животные, трансгенные по последовательностям человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека и связаны с ними, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

[00367] В контексте настоящего документа «изотип» относится к классу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

[00368] Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное к

антигену» используются в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

[00369] Термин «производные человеческого антитела» относится к любой модифицированной форме человеческого антитела, включая конъюгат антитела и другого активного фармацевтического ингредиента или антитела. Термины «конъюгат», «конъюгат антитело-лекарственное средство», «ADC» или «иммуноконъюгат» относятся к антителу или его фрагменту, конъюгированному с другим терапевтическим фрагментом, который может быть конъюгирован с антителами, описанными в настоящем документе, с использованием методов, доступных в данной области техники.

[00370] Подразумевается, что термины «гуманизированное антитело», «гуманизированные антитела» и «гуманизированный» означают антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. В человеческих каркасных последовательностях могут быть сделаны дополнительные модификации каркасной области. Гуманизированные формы антител нечеловеческого происхождения (например, мышинных) представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой человеческие иммуноглобулины (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из 15 гипервариабельной области отличного от человека вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или отличный от человека примат, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и возможностями. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv человеческого иммуноглобулина заменяют соответствующими остатками нечеловеческого происхождения. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет в реципиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации делают для дальнейшего улучшения характеристик антитела. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, и обычно из двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют гипервариабельным петлям иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все FR области представляют собой FR области последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, обычно человеческого иммуноглобулина. Дополнительную информацию см. в Jones, et al., *Nature* **1986**, 321, 522-525; Riechmann, et al., *Nature* **1988**, 332, 323-329; и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* **1992**, 2, 593-596. Описанные в настоящем документе антитела также могут быть модифицированы для использования любого варианта Fc, который считается способствующим улучшению (например, снижению) эффекторной функции и/или связывания FcR. Варианты Fc могут включать, например, любую из аминокислотных замен, описанных в публикациях международных

патентных заявок WO 1988/07089 A1, WO 1996/14339 A1, WO 1998/05787 A1, WO 1998/23289 A1, WO 1999/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 2000/09560 A2, WO 2000/32767 A1, WO 2000/42072 A2, WO 2002/44215 A2, WO 2002/060919 A2, WO 2003/074569 A2, WO 2004/016750 A2, WO 2004/029207 A2, WO 2004/035752 A2, WO 2004/063351 A2, WO 2004/074455 A2, WO 2004/099249 A2, WO 2005/040217 A2, WO 2005/070963 A1, WO 2005/077981 A2, WO 2005/092925 A2, WO 2005/123780 A2, WO 2006/019447 A1, WO 2006/047350 A2 и WO 2006/085967 A2; и патентах США №№ 5648260, 5739277, 5834250, 5869046, 6096871, 6121022, 6194551, 6242195, 6277375, 6528624, 6538124, 6737056, 6821505, 6998253 и 7083784, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00371] Подразумевается, что термин «химерное антитело» обозначает антитела, в которых последовательности переменных областей происходят от одного вида, а последовательности константной области происходят от другого вида, такие как антитело, в котором последовательности переменных областей получены из мышиного антитела, а последовательности константной области получены из человеческого антитела.

[00372] «Диатело» представляет собой небольшой фрагмент антитела с двумя антигенсвязывающими сайтами. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи (V_H), соединенный с переменным доменом легкой цепи (V_L) в одной и той же полипептидной цепи (V_H - V_L или V_L - V_H). При использовании линкера, слишком короткого для образования пары между двумя доменами в одной цепи, домены вынуждены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта. Диатела более подробно описаны, например, в европейском патенте EP 404097, публикации международной патентной заявки WO 93/11161; и Bolliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1993**, 90, 6444-6448.

[00373] Термин «гликозилирование» относится к модифицированному производному антитела. В агликозилированном антителе отсутствует гликозилирование. Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к антигену. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществить одну или более аминокислотных замен, которые приводят к удалению одного или более сайтов гликозилирования каркаса переменных областей, чтобы таким образом устранить гликозилирование в этом сайте. Агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену, как описано в патентах США №№ 5714350 и 6350861. Дополнительно или в качестве альтернативы, может быть создано антитело с измененным типом гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело с уменьшенным количеством остатков фукозила, или антитело с увеличенным количеством бисекционных структур GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные профили гликозилирования повышают возможности антител. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с

измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области техники и могут применяться в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела согласно изобретению, в результате чего получают антитело с измененным гликозилированием. Например, в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (альфа (1,6) фукозилтрансфераза), так что антитела, экспрессируемые в клеточных линиях Ms704, Ms705 и Ms709, не имеют на своих углеводах фукозных звеньев. Клеточные линии Ms704, Ms705 и Ms709 FUT8^{-/-} были созданы путем целевого нарушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с использованием двух замещающих векторов (см., например, публикацию патента США № 2004/0110704 или Yamane-Ohnuki, et al., *Biotechnol. Bioeng.*, **2004**, 87, 614-622). В качестве другого примера, в европейском патенте EP 1176195 описана клеточная линия с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование за счет уменьшения или устранения связанного с альфа-1,6 связью фермента, а также описаны клеточные линии, которые имеют низкую ферментативную активность по добавлению фукозы к N-ацетилглюкозамину, который связывается с Fc-областью антитела, или не обладают такой ферментативной активностью, например, линия клеток крысиной миеломы YB2/0 (ATCC CRL 1662). В публикации международной патентной заявки WO 03/035835 описан вариант клеточной линии CHO, клетки Lec 13, с уменьшенной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields, et al., *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 26733-26740). В публикации международной патентной заявки WO 99/54342 описаны клеточные линии, генетически модифицированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в этих генетически модифицированных клеточных линиях, демонстрируют повышенное количество бисекционных структур GlcNac, что приводит к увеличению активности АЗКЦ (антителозависимая клеточная цитотоксичность) этих антител (см. также Umana, et al., *Nat. Biotech.* **1999**, 17, 176-180). В качестве альтернативы, остатки фукозы антитела могут быть отщеплены с помощью фермента фукозидазы. Например, фукозидаза альфа-L-фукозидаза удаляет фукозильные остатки из антител, как описано в Tarentino, et al., *Biochem.* **1975**, 14, 5516-5523.

[00374] «Пэгилирование» относится к модифицированному антителу или его фрагменту, которое обычно подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, когда одна или более групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Пэгилирование может, например, увеличивать биологический (например, сывороточный) период полужизни антитела. Предпочтительно пэгилирование осуществляют посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с помощью реакционноспособной молекулы ПЭГ (или аналогичного реакционноспособного

водорастворимого полимера). В контексте настоящего документа подразумевается, что термин «полиэтиленгликоль» охватывает любые формы ПЭГ, которые применялись для образования производных других белков, такие как моно (C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеимид. Пэгилируемое антитело может представлять собой агликозилированное антитело. Способы пегилирования известны в данной области техники и могут применяться к антителам согласно изобретению, как описано, например, в европейских патентах EP 0154316 и EP 0401384, и патенте США № 5824778, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00375] Термин «биоаналог» означает биологический продукт, включая моноклональное антитело или белок, который очень схож с лицензированным в США референтным биологическим продуктом, без учета незначительных различий в клинически неактивных компонентах, и для которого нет клинически значимых различий между биологическим продуктом и референтным продуктом с точки зрения безопасности, чистоты и эффективности продукта. Более того, аналогичный биологический или «биоаналогичный» лекарственный препарат является биологическим лекарственным препаратом, аналогичным другому биологическому лекарственному препарату, который уже был разрешен к применению Европейским агентством по лекарственным средствам. Термин «биоаналог» также используется как синоним другими национальными и региональными регулирующими органами. Биологические продукты или биологические лекарственные препараты - это лекарственные препараты, которые производятся посредством или получены из биологического источника, такого как бактерия или дрожжи. Они могут состоять из относительно небольших молекул, таких как человеческий инсулин или эритропоэтин, или сложных молекул, таких как моноклональные антитела. Например, если референтный белок IL-2 представляет собой альдеслейкин (PROLEUKIN), белок, одобренный регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на альдеслейкин, является «биоаналогичным» альдеслейкину или является «биоаналогом» альдеслейкина. В Европе аналогичный биологический или «биоаналогичный» лекарственный препарат является биологическим лекарственным препаратом, аналогичным другому биологическому лекарственному препарату, который уже был разрешен к применению Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA). Соответствующей юридической основой для аналогичных биологических применений в Европе является статья 6 Регламента (ЕС) № 726/2004 и статья 10(4) Директивы 2001/83/ЕС с изменениями, и поэтому в Европе биоаналог может быть разрешен, одобрен для получения разрешения или являться предметом заявки на разрешение в соответствии со статьей 6 Регламента (ЕС) № 726/2004 и статьей 10(4) Директивы 2001/83/ЕС. Уже разрешенный оригинальный биологический лекарственный препарат может называться в Европе «референтным лекарственным препаратом». Некоторые требования к продукту, который считается биоаналогом, изложены в Руководстве СНМР (Комитет по лекарственным препаратам для

медицинского применения) по Аналогичным биологическим лекарственным препаратам. Кроме того, ЕМА предоставляет руководящие принципы для конкретных продуктов, включая руководящие принципы, касающиеся биоаналогов моноклональных антител, для каждого продукта, и публикует их на своем веб-сайте. Описанный в настоящем документе биоаналог может быть аналогичен референтному лекарственному препарату по характеристикам качества, биологической активности, механизму действия, профилям безопасности и/или эффективности. Кроме того, биоаналог может применяться или быть предназначенным для применения для лечения тех же состояний, что и референтный лекарственный препарат. Таким образом, можно считать, что описанный в настоящем документе биоаналог имеет характеристики качества, аналогичные или очень близкие к референтному лекарственному препарату. В качестве альтернативы или дополнительно, можно считать, что описанный в настоящем документе биоаналог имеет биологическую активность, аналогичную или очень близкую к референтному лекарственному препарату. В качестве альтернативы или дополнительно, можно считать, что описанный в настоящем документе биоаналог имеет профиль безопасности, аналогичный или очень близкий к референтному лекарственному препарату. В качестве альтернативы или дополнительно, можно считать, что описанный в настоящем документе биоаналог имеет эффективность, аналогичную или очень близкую к референтному лекарственному препарату. Как описано в настоящем документе, биоаналог в Европе сравнивают с референтным лекарственным препаратом, который был разрешен ЕМА. Однако в некоторых случаях биоаналог может сравниваться с биологическим лекарственным препаратом, который был разрешен за пределами Европейской экономической зоны (разрешенный вне ЕЭЗ «препарат сравнения») в отдельных исследованиях. Такие исследования включают, например, отдельные клинические и доклинические исследования *in vivo*. В контексте настоящего документа термин «биоаналог» также относится к биологическому лекарственному препарату, который был сопоставлен или может быть сопоставлен с разрешенным вне ЕЭЗ препаратом сравнения. Отдельными биоаналогами являются белки, такие как антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие части) и слитые белки. Биоаналог белка может иметь аминокислотную последовательность, которая имеет незначительные модификации в аминокислотной структуре (включая, например, делеции, добавления и/или замены аминокислот), которые не оказывают значительного влияния на функцию полипептида. Биоаналог может содержать аминокислотную последовательность, обладающую 97% или более высокой идентичностью аминокислотной последовательности его референтного лекарственного препарата, например, 97%, 98%, 99% или 100%. Биоаналог может содержать одну или более посттрансляционных модификаций, например, не ограничиваясь перечисленным, гликозилирование, окисление, дезамидирование и/или усечение, которая отличается/отличаются от посттрансляционных модификаций референтного лекарственного препарата, при условии, что различия не приводят к изменению безопасности и/или эффективности лекарственного препарата. Биоаналог может иметь идентичный или отличный от референтного лекарственного

препарата профиль гликозилирования. В частности, хотя и не исключительно, биоаналог может иметь другой профиль гликозилирования, если различия позволяют решать или призваны решить проблемы безопасности, связанные с референтным лекарственным препаратом. Кроме того, биоаналог может отличаться от референтного лекарственного препарата, например, по силе его действия, лекарственной форме, составу, вспомогательным веществам и/или форме выпуска, при условии, что безопасность и эффективность лекарственного препарата не ухудшаются. Биоаналог может иметь отличия, например, в фармакокинетических (ФК) и/или фармакодинамических (ФД) профилях по сравнению с референтным лекарственным препаратом, но все же считается достаточно схожим с референтным лекарственным препаратом, чтобы быть разрешенным или считаться подходящим для выдачи разрешения. В определенных обстоятельствах биоаналог демонстрирует другие характеристики связывания по сравнению с референтным лекарственным препаратом, при этом другие характеристики связывания не рассматриваются регулирующим органом, таким как ЕМА, как препятствие для получения разрешения в качестве аналогичного биологического препарата. Термин «биоаналог» также используется как синоним другими национальными и региональными регулирующими органами.

Процессы производства ТП

[00376] Иллюстративный процесс ТП, известный как процесс 2А, включающий некоторые из этих признаков, изображен на фиг. 2, а некоторые из преимуществ этого варианта осуществления настоящего изобретения по сравнению с процессом 1С описаны на фиг. F и G. Вариант осуществления процесса 2А показан на фиг. 1.

[00377] Как обсуждается в настоящем документе, настоящее изобретение может включать этап, связанный с повторной стимуляцией криоконсервированных ТП для повышения их метаболической активности и, таким образом, относительного здоровья, перед трансплантацией пациенту, а также способы тестирования указанного метаболического здоровья. Как в общем описано в настоящем документе, ТП обычно берут из образца, взятого у пациента, и подвергают обработке для увеличения их количества перед трансплантацией пациенту. В некоторых вариантах осуществления ТП необязательно могут быть генетически модифицированы, как обсуждается ниже.

[00378] В некоторых вариантах осуществления ТП могут быть криоконсервированы. После размораживания они также могут быть повторно стимулированы для увеличения их метаболизма перед инфузией пациенту.

[00379] В некоторых вариантах осуществления первая экспансия (включая процессы, называемые preREP, а также процессы, показанные на фиг. 1 как этап А) сокращен до 3-14 дней, а вторая экспансия (включая процессы, называемые REP, а также процессы, показанные на фиг. 1 как этап В) сокращен до 7-14 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия (например, экспансия, описанная как этап В на фиг. 1) сокращена до 11 дней, и вторая экспансия (например, экспансия, как описано на этапе D

на фиг. 1) сокращена до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления комбинация первой экспансии и второй экспансии (например, экспансии, описанные как этап В и этап D на фиг. 1) сокращена до 22 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в разделе примеров и на фигурах.

[00380] Приведенные ниже обозначения «этап» А, В, С и т. д. относятся к фиг. 1 и относятся к отдельным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок проведения этапов ниже и на фиг. 1 является иллюстративным, и настоящей заявкой и раскрытыми в настоящем документе способами предусмотрены любая комбинация или порядок этапов, а также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов.

ЭТАП А. Получение образца опухоли пациента

[00381] Как правило, ТП первоначально получают из образца опухоли пациента («первичные ТП»), а затем подвергают экспансии до более крупной популяции для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют, повторно стимулируют, как указано в настоящем документе, и необязательно оценивают на фенотип и метаболические параметры как показатель здоровья ТП.

[00382] Образец опухоли пациента может быть получен с использованием способов, известных в данной области техники, обычно с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии или других средств для получения образца, содержащего смесь опухолевых и ТП-клеток. В некоторых вариантах осуществления используют взятие образцов из множества очагов поражения. В некоторых вариантах осуществления хирургическая резекция, пункционная биопсия, толстоигольная биопсия, малая биопсия или другие средства для получения образца, содержащего смесь опухолевых и ТП-клеток, включают в себя взятие образцов из множества очагов поражения (т. е. получение образцов из одного или более очагов и/или локализаций опухоли у пациента, а также одной или более опухолей в одной и той же локализации или в непосредственной близости). Как правило, образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой опухоль жидких тканей, такую как опухоль, образовавшаяся вследствие гематологического злокачественного новообразования. Салидная опухоль может представлять собой опухоль легочной ткани. В некоторых вариантах осуществления подходящие ТП получают из немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ).

[00383] После получения образец опухоли обычно фрагментируют с помощью острой диссекции на мелкие кусочки от 1 до приблизительно 8 мм³, причем особенно подходящим является размер приблизительно от 2 до 3 мм³. ТП культивируют из этих фрагментов с использованием ферментативных гидролизатов опухолей. Такие гидролизаты опухолей могут быть получены путем инкубации в ферментных средах (например, буфер Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 мМ глутамата, 10 мкг/мл

гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, с использованием гомогенизатора ткани). Гидролизаты опухолей могут быть получены путем помещения опухоли в ферментную среду и механической диссоциации опухоли в течение примерно 1 минуты с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂ с последующими повторными циклами механической диссоциации и инкубации при вышеуказанных условиях, пока не будут присутствовать только небольшие кусочки ткани. По окончании этого процесса, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с использованием разветвленного гидрофильного полисахарида FICOLL. Могут быть использованы альтернативные методы, известные в данной области техники, такие как описанные в публикации заявки на патент США № 2012/0244133 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Любой из вышеперечисленных методов может быть использован в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для способов экспансии ТП или способов лечения рака.

[00384] В общем собранная клеточная суспензия называется «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00385] В некоторых вариантах осуществления фрагментация включает физическую фрагментацию, включая, например, диссекцию, а также ферментативный гидролиз. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой физическую фрагментацию. В некоторых вариантах осуществления фрагментация представляет собой диссекцию. В некоторых вариантах осуществления фрагментацию осуществляют путем ферментативного гидролиза. В некоторых вариантах осуществления ТП могут быть первоначально культивированы из ферментативных гидролизатов опухолей и фрагментов опухолей, полученных от пациентов. В одном из вариантов осуществления ТП могут быть первоначально культивированы из ферментативных гидролизатов опухолей и фрагментов опухолей, полученных от пациентов.

[00386] В некоторых вариантах осуществления, когда опухоль представляет собой солидную опухоль, опухоль подвергается физической фрагментации после получения образца опухоли, например, на этапе А (как показано на фиг. 1). В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит до криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления фрагментация происходит после получения опухоли и в отсутствие какой-либо криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления опухоль является фрагментированной, и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления опухоль является фрагментированной, и 30 или 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления опухоль является фрагментированной, и 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для

первой экспансии. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 4 до приблизительно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем приблизительно 27 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов общим объемом от приблизительно 1300 мм^3 до приблизительно 1500 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов общим объемом приблизительно 1350 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 50 фрагментов общей массой от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включает приблизительно 4 фрагмента.

[00387] В некоторых вариантах осуществления ТП получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли получают путем острой диссекции. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм^3 до 10 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм^3 до 8 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 1 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 2 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 3 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 4 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 5 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 6 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 7 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 9 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 10 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухоли составляют $1\text{-}4 \text{ мм} \times 1\text{-}4 \text{ мм} \times 1\text{-}4 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли составляют $1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли составляют $2 \text{ мм} \times 2 \text{ мм} \times 2 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли составляют $3 \text{ мм} \times 3 \text{ мм} \times 3 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли составляют $4 \text{ мм} \times 4 \text{ мм} \times 4 \text{ мм}$.

[00388] В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы минимизировать количество геморрагических, некротических и/или жировых тканей на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы минимизировать количество геморрагической ткани на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы минимизировать количество некротической ткани на каждом кусочке. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют, чтобы минимизировать количество жировой ткани на каждом кусочке.

[00389] В некоторых вариантах осуществления фрагментацию опухоли проводят для сохранения внутренней структуры опухоли. В некоторых вариантах осуществления

фрагментацию опухоли проводят без осуществления пилящего движения скальпелем. В некоторых вариантах осуществления ТПЛ получают из гидролизатов опухолей. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухолей были получены путем инкубации в ферментной среде, например, не ограничиваясь перечисленным, RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 ЕД/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). После помещения опухоли в ферментную среду опухоль может быть подвергнута механической диссоциации в течение примерно 1 минуты. Затем раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, а затем снова подвергнут механическому разрушению в течение примерно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂ опухоль может быть подвергнута механическому разрушению в третий раз в течение примерно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления после третьего механического разрушения, если присутствовали большие кусочки ткани, образец подвергали 1 или 2 дополнительным механическим диссоциациям с дополнительными 30 минутами инкубации при 37°C в 5% CO₂ или без нее. В некоторых вариантах осуществления по окончании последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll.

[00390] В некоторых вариантах осуществления собранная клеточная суспензия перед первым этапом экспансии называется «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00391] В некоторых вариантах осуществления клетки могут быть необязательно заморожены после сбора образца и храниться в замороженном виде до начала экспансии, описанной на этапе В, который более подробно описана ниже, а также проиллюстрирована на фиг. 1.

ЭТАП В. Первая экспансия

[00392] В некоторых вариантах осуществления настоящие способы обеспечивают получение молодых ТПЛ, которые способны к большему количеству циклов репликации при введении субъекту/пациенту и, как таковые, могут обеспечивать дополнительные терапевтические преимущества по сравнению с более старыми ТПЛ (т. е., ТПЛ, которые дополнительно подверглись большему количеству циклов репликации перед введением субъекту/пациенту). Особенности молодых ТПЛ описаны в литературе, например, в источниках Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125-7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005); и Tran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008), все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00393] Различные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются соматической рекомбинацией ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (от англ. variable - вариабельный), D (от англ. diversity - разнообразие), J (от англ. joining - соединяющий) и C (от англ. constant - константный) определяют специфичность связывания и последующие сферы применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания ТП, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП, полученными с использованием других способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от тех, которые воплощены на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП, полученными с использованием способов, называемых процессом IC, как проиллюстрировано на фиг. 5 и/или фиг. 6. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные при первой экспансии, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в Т-клеточных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии TCRab (т. е. TCR α/β).

[00394] После диссекции или ферментативного гидролиза фрагментов опухоли, например, как описано на этапе А на фиг. 1, полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, которые способствуют росту ТП по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухолей инкубируют в лунках на 2 мл в среде, содержащей инактивированную человеческую сыворотку группы АВ с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 3 до 14 дней, с получением общей популяции ТП, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы ТП-клеток. В

некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение от 7 до 14 дней с получением общей популяции ТП, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы ТП-клеток. В некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение от 10 до 14 дней с получением общей популяции ТП, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы ТП-клеток. В некоторых вариантах осуществления эту первичную популяцию клеток культивируют в течение приблизительно 11 дней с получением общей популяции ТП, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы ТП-клеток.

[00395] В предпочтительном варианте осуществления экспансия ТП может быть проведена с использованием этапа первоначальной экспансии общей массы ТП (например, как описанные на этапе В на фиг. 1, который может включать процессы, называемые pre-REP), как описано ниже и в настоящем документе, с последующей второй экспансией (этап D, включая процессы, называемые этапами протокола быстрой экспансии (REP)), как описано ниже в разделе Этап D и в настоящем документе, с последующей необязательной криоконсервацией и последующим вторым этапом D (включая процессы, называемые этапами повторной стимуляции REP), как описано ниже и в настоящем документе. ТП, полученные в результате этого процесса, могут быть необязательно охарактеризованы по фенотипическим характеристикам и метаболическим параметрам, как описано в настоящем документе.

[00396] В вариантах осуществления, где культивирование ТП начинают в 24-луночных планшетах, например, с использованием 24-луночного кластера для клеточных культур Costar с плоским дном (Corning Incorporated, Корнинг, Нью-Йорк), каждая лунка может быть засеяна 1×10^6 клеток гидролизата опухоли или одним фрагментом опухоли в 2 мл полной среды (СМ) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Эмеривилл, Калифорния). В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм³ до 10 мм³.

[00397] В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии называется «СМ», сокращение от «culture media» (культуральной среды). В некоторых вариантах осуществления СМ для этапа В состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX с добавками 10% человеческой сыворотки группы АВ, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, где культивирование начинают в газопроницаемых колбах вместимостью 40 мл и газопроницаемым кремниевым дном площадью 10 см² (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, Миннесота) (фиг. 1), каждую колбу загружали $10-40 \times 10^6$ жизнеспособных клеток гидролизата опухоли или 5-30 фрагментами опухоли в 10-40 мл СМ с IL-2. И G-Rex10, и 24-луночные планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ и через 5 дней после начала культивирования половину среды удаляли и заменяли свежими СМ и IL-2, и после дня 5 половину среды заменяли раз в 2-3 дня.

[00398] После приготовления фрагментов опухоли полученные клетки (т. е. фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, в условиях, которые

способствуют росту ТП по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухолей инкубируют в лунках на 2 мл в среде, содержащей инактивированную человеческую сыворотку группы АВ (или, в некоторых случаях, как указано в настоящем документе, в присутствии популяции клеток иАПК) с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту первичную популяцию клеток культивируют в течение нескольких дней, обычно от 10 до 14 дней, с получением общей популяции ТП, обычно приблизительно 1×10^8 общей массы ТП-клеток. В некоторых вариантах осуществления среда для выращивания во время первой экспансии содержит ИЛ-2 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления ИЛ представляет собой рекомбинантный человеческий ИЛ-2 (rhИЛ-2). В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность $20-30 \times 10^6$ МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 20×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 25×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 30×10^6 МЕ/мг для флакона на 1 мг. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию $4-8 \times 10^6$ МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию $5-7 \times 10^6$ МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор ИЛ-2 готовят, как описано в примере 5. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии содержит приблизительно 10 000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 9 000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 8 000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 7 000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2 или приблизительно 5 000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 9 000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 5 000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 8 000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6 000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 7 000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6 000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии содержит приблизительно 6 000 МЕ/мл ИЛ-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит ИЛ-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно

МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл П-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит П-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл П-21.

[00401] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл и приблизительно 1 мкг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления антитело ОКТ-3 представляет собой муромонаб.

ТАБЛИЦА 3: Аминокислотные последовательности муромонаба (пример антитела ОКТ-3)

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:1 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNV 60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120
	KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS

	KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNMFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00402] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF включает агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00403] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00404] В некоторых вариантах осуществления первая культуральная среда для экспансии называется «СМ», сокращение от «culture media» (культуральной среды). В некоторых вариантах осуществления она называется СМ1 (культуральная среда 1). В некоторых вариантах осуществления СМ состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX с добавками 10% человеческой сыворотки группы АВ, 25 мМ Нерес и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, где культивирование начинают в газопроницаемых колбах вместимостью 40 мл и газопроницаемым кремниевым дном площадью 10 см² (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, Миннесота) (фиг. 1), каждую колбу загружали 10-40×10⁶ жизнеспособных клеток гидролизата опухоли или 5-30 фрагментами опухоли в 10-40 мл СМ с IL-2. И G-Rex10, и 24-луночные планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ и через 5 дней после начала

культивирования половину среды удаляли и заменяли свежими СМ и П-2, и после дня 5 половину среды заменяли раз в 2-3 дня. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой СМ1, описанную в разделе примеров, см. пример 1. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия происходит в исходной среде для культивирования клеток или в первой среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления исходная среда для культивирования клеток или первая среда для культивирования клеток содержит П-2.

[00405] В некоторых вариантах осуществления процесс первой экспансии (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе В на фиг. 1, которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP) сокращен до 3-14 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия (включая процессы, такие как, например, описанные на этапе В на фиг. 1, которые могут включать процессы, иногда называемые pre-REP) сокращена до 7-14 дней, как обсуждается в разделе примеров и показано на фиг. 4 и 5, а также включая, например, экспансию, описанную на этапе В на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия этапа В сокращена до 10-14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия сокращена до 11 дней, как обсуждается, например, для экспансии, описанной на этапе В на фиг. 1.

[00406] В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 1 дня до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 2 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 3 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 4 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 5 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 6 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 7 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 8 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 9 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 10 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 11 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 12 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 13 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может

продолжаться в течение от 1 дня до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 2 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 3 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 4 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 5 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 6 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 7 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 8 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 9 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение от 10 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия TIL может продолжаться в течение 11 дней.

[00407] В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время первой экспансии используют комбинацию IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время первой экспансии могут быть включены IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их комбинации, в том числе, например, во время процессов этапа В согласно фиг. 1, а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время первой экспансии используют комбинацию IL-2, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время процессов этапа В согласно фиг. 1, а также как описано в настоящем документе, могут быть включены IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации.

[00408] В некоторых вариантах осуществления процесс первой экспансии (включая процессы, называемые pre-REP; например, этап В согласно фиг. 1) сокращен до 3-14 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия этапа В сокращена до 7-14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия этапа В сокращена до 10-14 дней. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия сокращена до 11 дней.

[00409] В некоторых вариантах осуществления первую экспансию, например, этап В согласно фиг. 1, проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В некоторых вариантах осуществления один используемый биореактор представляет собой, например, G-REX -10 или G-REX -100. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой один биореактор.

ЭТАП С. Переход от первой экспансии ко второй экспансии

[00410] В некоторых случаях общая популяция TIL, полученная в результате первой экспансии, включая, например, популяцию TIL, полученную, например, в результате этапа В, показанной на фиг. 1, может быть немедленно криоконсервирована с

использованием протоколов, обсуждаемых ниже в настоящем документе. В качестве альтернативы, популяция ТП, полученная в результате первой экспансии, называемая второй популяцией ТП, может быть подвергнута второй экспансии (которая может включать экспансии, иногда называемые REP), а затем криоконсервирована, как обсуждается ниже. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные ТП будут применяться в терапии, первая популяция ТП (иногда называемая общей популяцией ТП) или вторая популяция ТП (которая в некоторых вариантах осуществления может включать популяции, называемые популяциями REP ТП) могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки до экспансии или после первой экспансии и до второй экспансии.

[00411] В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные в результате первой экспансии (например, в результате этапа В, как показано на фиг. 1), хранят до проведения фенотипирования для отбора. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные в результате первой экспансии (например, в результате этапа В, как показано на фиг. 1), не хранят и сразу же переходят ко второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные в результате первой экспансии, не криоконсервируют после первой экспансии и до второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 3 дней до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 4 дней до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 4 дней до 10 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно от 7 дней до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через приблизительно 14 дней с момента фрагментации.

[00412] В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит в течение от 1 дня до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления первая экспансия ТП может продолжаться в течение от 2 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит в течение от 3 дней до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии происходит в течение от 4 дней до 14 дней с момента фрагментации. В некоторых

(например, в некоторых вариантах осуществления во время перехода от этапа В к этапу D, как показано на фиг. 1, отсутствует хранение). В некоторых вариантах осуществления переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ТП из первой экспансии, вторая популяция ТП, сразу же переходят ко второй экспансии без какого-либо переходного периода.

[00414] В некоторых вариантах осуществления переход от первой экспансии ко второй экспансии, например, этапа С согласно фиг. 1, проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии ТП используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В некоторых вариантах осуществления один используемый биореактор представляет собой, например, G-REX -10 или G-REX -100. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой один биореактор.

1. Цитокины

[00415] В описанных в настоящем документе способах экспансии обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, IL-2, как это известно в данной области техники.

[00416] В качестве альтернативы, также возможно использование комбинаций цитокинов для быстрой экспансии и/или второй экспансии ТП, с комбинациями двух или более из IL-2, IL-15 и IL-21, как в целом описано в международной публикации WO 2015/189356 и международной публикации WO 2015/189357, настоящим в явном виде включенных посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, возможные комбинации включают IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21 и IL-2, IL-15 и IL-21, причем последняя является особенно подходящей для многих вариантов осуществления. Использование комбинаций цитокинов, в частности, способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

ТАБЛИЦА 4: Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:3 рекомбинантный человеческий IL- 2 (rhIL-2)	MAPSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Альдеслейкин	PTSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGS TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132

SEQ ID NO:5 рекомбинантный человеческий IL- 4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 рекомбинантный человеческий IL- 7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSTMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 рекомбинантный человеческий IL- 15 (rhIL-15)	MNWWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 рекомбинантный человеческий IL- 21 (rhIL-21)	MQDRHMIRM MR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVTI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

ЭТАП D. Вторая экспансия

[00417] В некоторых вариантах осуществления популяцию TIL-клеток увеличивают в численности после сбора и начальной обработки общей массы, например, после этапа A и этапа B и перехода, называемого этапом C, как показано на фиг. 1). Эта дополнительная экспансия называется в настоящем документе второй экспансией, которая может включать в себя процессы экспансии, обычно называемые в данной области техники процессом быстрой экспансии (REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1). Вторую экспансию обычно осуществляют с использованием культуральной среды, содержащей ряд компонентов, включая фидерные клетки, источник цитокинов и антитело к CD3, в газопроницаемом контейнере.

[00418] В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия или вторая экспансия TIL (которая может включать экспансии, иногда называемые REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1) TIL могут проводиться с использованием любых колб или контейнеров для TIL, известных специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия TIL может продолжаться в течение

от приблизительно 7 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 8 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 9 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 10 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 11 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 12 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение от приблизительно 13 дней до приблизительно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия ТП может продолжаться в течение приблизительно 14 дней.

[00419] В одном из вариантов осуществления вторая экспансия может быть проведена в газопроницаемом контейнере с использованием способов согласно настоящему изобретению (включая, например, экспансии, называемые REP; а также процессы, указанные на этапе D на фиг. 1). Например, ТП могут быть подвергнуты быстрой экспансии с помощью неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина 2 (IL-2) или интерлейкина 15 (IL-15). Неспецифический стимул Т-клеточного рецептора может включать, например, антитело к CD3, например, приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, мышинового моноклонального антитела к CD3 (коммерчески доступно от Ortho-McNeil, Паритан, Нью-Джерси или Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния) или UHCT-1 (коммерчески доступно от BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США). ТП могут быть подвергнуты экспансии для индукции дополнительной стимуляции ТП *in vitro* путем включения одного или более антигенов во время второй экспансии, включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы), рака, которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, например, пептида, связывающего человеческий лейкоцитарный антиген А2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1: 26-35 (27 л) или gp1 00:209-217 (210 M), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, например, 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназы, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. ТП также могут быть подвергнуты быстрой экспансии путем повторной стимуляции тем же антигеном(ами) рака, подаваемым на HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. В качестве альтернативы, ТП могут быть дополнительно повторно стимулированы, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2. В некоторых вариантах осуществления повторная стимуляция происходит как часть второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2.

[00420] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или от 8000 МЕ/мл IL-2.

[00421] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл и приблизительно 1 мкг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления антитело ОКТ-3 представляет собой муромонаб.

[00422] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF включает агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00423] В некоторых вариантах осуществления в дополнение к одному или более агонистам TNFRSF среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00424] В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время второй экспансии используют комбинацию IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время второй экспансии могут быть включены IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их комбинации, в том числе, например, во время процессов этапа D согласно фиг. 1, а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в качестве комбинации во время второй экспансии используют комбинацию IL-2, IL-15 и IL-21. В некоторых вариантах осуществления во время процессов этапа D согласно фиг. 1, а также как описано в настоящем документе, могут быть включены IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их комбинации.

[00425] В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия может быть проведена в среде для культивирования клеток с добавками, содержащей IL-2, ОКТ-3, антигенпрезентирующие фидерные клетки и, необязательно, агонист TNFRSF. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в среде для культивирования клеток с добавками. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток с добавками содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК; также называемые антигенпрезентирующими фидерными клетками). В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия происходит в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (т. е. антигенпрезентирующие клетки).

[00426] В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит приблизительно 500 МЕ/мл IL-15, приблизительно 400 МЕ/мл IL-15, приблизительно 300 МЕ/мл IL-15, приблизительно 200 МЕ/мл IL-15, приблизительно 180 МЕ/мл IL-15, приблизительно 160 МЕ/мл IL-15, приблизительно 140 МЕ/мл IL-15, приблизительно 120 МЕ/мл IL-15 или приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 500 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 400 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 300 МЕ/мл IL-15 до приблизительно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15. В одном из

вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 180 МЕ/мл IL-15.

[00427] В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит приблизительно 20 МЕ/мл IL-21, приблизительно 15 МЕ/мл IL-21, приблизительно 12 МЕ/мл IL-21, приблизительно 10 МЕ/мл IL-21, приблизительно 5 МЕ/мл IL-21, приблизительно 4 МЕ/мл IL-21, приблизительно 3 МЕ/мл IL-21, приблизительно 2 МЕ/мл IL-21, приблизительно 1 МЕ/мл IL-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 20 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 15 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 12 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 10 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит от приблизительно 5 МЕ/мл IL-21 до приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии содержит приблизительно 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1 МЕ/мл IL-21.

[00428] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК) представляют собой МНПК. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и МНПК и/или антигенпрезентирующих клеток при быстрой экспансии и/или второй экспансии составляет приблизительно 1 к 25, приблизительно 1 к 50, приблизительно 1 к 100, приблизительно 1 к 125, приблизительно 1 к 150, приблизительно 1 к 175, приблизительно 1 к 200, приблизительно 1 к 225, приблизительно 1 к 250, приблизительно 1 к 275, приблизительно 1 к 300, приблизительно 1 к 325, приблизительно 1 к 350, приблизительно 1 к 375, приблизительно 1 к 400 или приблизительно 1 к 500. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и МНПК при быстрой экспансии и/или второй экспансии составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и МНПК при быстрой экспансии и/или второй экспансии составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00429] В одном из вариантов осуществления РЕР и/или вторую экспансию проводят в колбах, в которых общую массу ТП смешивают со 100- или 200-кратным избытком инактивированных фидерных клеток, 30 мг/мл антитела к CD3 ОКТ3 и 3000

МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Осуществляют замену среды (обычно замену 2/3 среды путем респирации свежей средой) до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для выращивания. Альтернативные камеры для выращивания включают колбы G-REX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается ниже.

[00430] В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия (которая может включать процессы, называемые процессом REP) сокращена до 7-14 дней, как обсуждается в разделе примеров и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия сокращена до 11 дней.

[00431] В одном из вариантов осуществления REP и/или вторая экспансия могут быть проведены с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов, как описано ранее (Tran, et al., *J. Immunother.* **2008**, 31, 742-51; Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42) или газопроницаемой посуды для культивирования (колбы G-Rex). В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию (включая экспансии, называемые быстрыми экспансиями) проводят в колбах T-175, и в каждую колбу T-175 может быть добавлено приблизительно 1×10^6 TIL, суспендированных в 150 мл среды. TIL могут быть культивированы в смеси 1:1 CM и среды AIM-V с добавками 3000 МЕ на мл IL-2 и 30 нг на мл антитела к CD3. Колбы T-175 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂. Половина среды может быть заменена на 5 день с использованием среды 50/50 с 3000 МЕ на мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления на день 7 клетки из двух колб T-175 могут быть объединены в 3-литровом пакете, и к 300 мл суспензии TIL может быть добавлено 300 мл AIM V с 5% человеческой сыворотки группы АВ и 3000 МЕ на мл IL-2. Количество клеток в каждом пакете подсчитывали каждый день или два, и добавляли свежую среду для поддержания количества клеток между $0,5$ и $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[00432] В одном из вариантов осуществления вторая экспансия (которое может включать экспансии, называемые REP, а также экспансии, указанные на этапе D на фиг. 1) может быть проведена в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл с газопроницаемыми кремниевыми доньями на 100 см (G-Rex 100, коммерчески доступные от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 TIL могут быть культивированы с МНПК в 400 мл среды 50/50 с добавками 5% человеческой сыворотки группы АВ, 3000 МЕ на мл IL-2 и 30 нг на мл антитела к CD3 (ОКТ3). Колбы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂. На день 5 250 мл супернатанта может быть изъято, помещено в центрифужные флаконы и центрифугировано при 1500 об/мин ($491 \times g$) в течение 10 минут. Осадки TIL могут быть повторно суспендированы в 150 мл свежей среды с 5% человеческой сыворотки группы АВ, 3000 МЕ на мл IL-2, и добавлены обратно в исходные колбы G-Rex 100. При последовательной экспансии TIL в колбах G-Rex 100 на день 7 TIL в каждой G-Rex 100 могут быть суспендированы в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточная суспензия может быть разделена на 3 аликвоты по 100 мл, которые могут быть использованы для посева в 3 колбах G-Rex 100. Затем в каждую колбу может быть добавлено 150 мл AIM-V с 5% человеческой сыворотки

группы АВ и 3000 МЕ на мл IL-2. Колбы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂, и через 4 дня в каждую колбу G-REX 100 может быть добавлено 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл IL-2. Клетки могут быть собраны на день 14 культивирования.

[00433] В одном из вариантов осуществления вторую экспансию (включая экспансии, называемые REP) проводят в колбах, в которых общую массу TIL смешивают со 100- или 200-кратным избытком инактивированных фидерных клеток, 30 мг/мл антитела к CD3 ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. В некоторых вариантах осуществления замену среды проводят до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для выращивания. В некоторых вариантах осуществления 2/3 среды заменяют респирацией свежей средой. В некоторых вариантах осуществления альтернативные камеры для выращивания включают колбы G-REX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается ниже.

[00434] В одном из вариантов осуществления проводят вторую экспансию (включая экспансии, называемые REP), и она дополнительно включает этап, на котором осуществляют отбор TIL по наилучшей противоопухолевой реактивности. Может быть использован любой метод отбора, известный в данной области техники. Например, для отбора TIL по наилучшей противоопухолевой реактивности могут быть использованы способы, описанные в публикации заявки на патент США № 2016/0010058 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00435] Необязательно, после второй экспансии (включая экспансии, называемые экспансией REP) может быть проведен анализ жизнеспособности клеток с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, на образце общей массы TIL может быть проведен анализ по вытеснению трипанового синего, который избирательно маркирует мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления клетки в образцах TIL могут быть подсчитаны и подвергнуты определению жизнеспособности с помощью автоматического счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Лоренс, Массачусетс). В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность определяют в соответствии со стандартным протоколом автоматического счетчика клеток Cellometer K2 Image Cytometer.

[00436] В некоторых вариантах осуществления вторая экспансия (включая экспансии, называемые REP) TIL может быть проведена с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов, как описано ранее (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., **2008**, J Immunother., 31:742-751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) или газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию проводят с использованием колб. В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию проводят с использованием газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию проводят в колбах T-175, и приблизительно 1×10^6 TIL суспендируют в приблизительно 150 мл среды, которую добавляют в каждую колбу T-175. TIL культивируют с

облученными (50 Гр) аллогенными МНПК в качестве «питающих» клеток в соотношении 1 к 100, и клетки культивируют в смеси 1:1 СМ и среды AIM-V (среда 50/50) с добавками 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Колбы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления половину среды заменяют на день 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления на день 7 клетки из 2 колб T-175 объединяют в 3-литровом пакете, и к 300 мл суспензии TIL добавляют 300 мл AIM-V с 5% человеческой сыворотки группы АВ и 3000 МЕ/мл IL-2. Количество клеток в каждом пакете может подсчитываться каждый день или два, и может быть добавлена свежая среда для поддержания количества клеток между приблизительно 0,5 и приблизительно $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[00437] В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию (включая экспансии, называемые REP) проводят в колбах емкостью 500 мл с газопроницаемыми кремниевыми доньями площадью 100 см² (G-Rex 100, Wilson Wolf) (фиг. 1), приблизительно 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с облученными аллогенными МНПК в соотношении 1 к 100 в 400 мл среды 50/50 с добавками 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления на день 5 250 мл супернатанта удаляют, помещают в центрифужные флаконы и центрифугируют при 1500 об/мин (491 g) в течение 10 минут. Затем осадки TIL могут быть повторно суспендированы в 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и добавлены обратно в исходные колбы G-Rex 100. В вариантах осуществления, где TIL подвергают последовательной экспансии в колбах G-Rex 100 на день 7 TIL в каждой G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточную суспензию разделяют на три аликвоты по 100 мл, которые используют для посева в 3 флаконах G-Rex 100. Затем в каждую колбу добавляют 150 мл AIM-V с 5% человеческой сыворотки группы АВ и 3000 МЕ/мл IL-2. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂, и через 4 дня в каждую колбу G-Rex 100 добавляют 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2. Клетки собирают на 14 день культивирования.

[00438] Различные антигенные рецепторы T- и B-лимфоцитов продуцируются соматической рекомбинацией ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (от англ. variable - вариабельный), D (от англ. diversity - разнообразие), J (от англ. joining - соединяющий) и C (от англ. constant - константный) определяют специфичность связывания и последующие сферы применения иммуноглобулинов и T-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение обеспечивает способ создания TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара T-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные настоящим способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара T-клеток. В некоторых вариантах осуществления TIL, полученные при второй экспансии, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара T-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия T-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах

осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в иммуноглобулинах, а именно, в легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в Т-клеточных рецепторах. В некоторых вариантах осуществления разнообразие имеет место в одном из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления наблюдается увеличение экспрессии TCRab (т. е. TCR α/β).

[00439] В некоторых вариантах осуществления вторая культуральная среда для экспансии (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток) содержит IL-2, ОКТ-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно обсуждается ниже.

[00440] В некоторых вариантах осуществления вторую экспансию, например, этап D согласно фиг. 1, проводят в биореакторе с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии TIL используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В некоторых вариантах осуществления один используемый биореактор представляет собой, например, G-REX -10 или G-REX -100. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой один биореактор.

1. Питающие клетки и антигенпрезентирующие клетки

[00441] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры второй экспансии (например, включая экспансию, описанную на этапе D на фиг. 1, а также экспансии, называемые REP) требуют избытка фидерных клеток во время экспансии TIL REP и/или во время второй экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque.

[00442] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах REP, как описано в разделе примеров, где представлен иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных МНПК.

[00443] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и принимаются для использования в процедурах экспансии TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на день 14 меньше исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии).

[00444] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и принимаются для использования в процедурах экспансии ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и П-2, на день 7 и день 14 не увеличилось по сравнению с первоначальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 РЕР и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии). В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл П-2.

[00445] В некоторых вариантах осуществления изобретения МНПК считаются неспособными к репликации и принимаются для использования в процедурах экспансии ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и П-2, на день 7 и день 14 не увеличилось по сравнению с первоначальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 РЕР и/или день 0 второй экспансии (т. е. день начала второй экспансии). В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела ОКТ3 и 1000-6000 МЕ/мл П-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-5000 МЕ/мл П-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-4000 МЕ/мл П-2. В некоторых вариантах осуществления МНПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела ОКТ3 и 2500-3500 МЕ/мл П-2.

[00446] В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МНПК. В некоторых вариантах осуществления антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет приблизительно 1 к 25, приблизительно 1 к 50, приблизительно 1 к 100, приблизительно 1 к 125, приблизительно 1 к 150, приблизительно 1 к 175, приблизительно 1 к 200, приблизительно 1 к 225, приблизительно 1 к 250, приблизительно 1 к 275, приблизительно 1 к 300, приблизительно 1 к 325, приблизительно 1 к 350, приблизительно 1 к 375, приблизительно 1 к 400 или приблизительно 1 к 500. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение ТП и антигенпрезентирующих фидерных клеток при второй экспансии составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00447] В одном из вариантов осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $2,5 \times 10^9$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 ТП. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур второй экспансии требуется соотношение приблизительно $2,5 \times 10^9$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 ТП. В еще одном варианте осуществления для описанных в настоящем документе процедур

второй экспансии требуется приблизительно $2,5 \times 10^9$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 ТП.

[00448] В одном из вариантов осуществления описанные в настоящем документе процедуры второй экспансии требуют избытка фидерных клеток во время второй экспансии. Во многих вариантах осуществления фидерные клетки представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (МНПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров. МНПК получают с использованием стандартных методов, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque. В одном из вариантов осуществления вместо МНПК используют искусственные антигенпрезентирующие клетки (аАРС).

[00449] Как правило, аллогенные МНПК подвергают инактивации, либо посредством облучения, либо посредством тепловой обработки, и используют в процедурах экспансии ТП, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на фигурах и в разделе примеров.

[00450] В одном из вариантов осуществления искусственные антигенпрезентирующие клетки используют во второй экспансии в качестве замены МНПК или в комбинации с ними.

2. Цитокины

[00451] В описанных в настоящем документе способах экспансии обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, ИЛ-2, как это известно в данной области техники.

[00452] В качестве альтернативы, также возможно использование комбинаций цитокинов для быстрой экспансии и/или второй экспансии ТП, с комбинациями двух или более из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, как в целом описано в международной публикации WO 2015/189356 и международной публикации WO 2015/189357, настоящим в явном виде включенных посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, возможные комбинации включают ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-2 и ИЛ-21, ИЛ-15 и ИЛ-21 и ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, причем последняя является особенно подходящей для многих вариантов осуществления. Использование комбинаций цитокинов, в частности, способствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

ЭТАП Е. Сбор ТП

[00453] После втором этапе экспансии клетки могут быть собраны. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают после одной, двух, трех, четырех или более этапов экспансии, например, как показано на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают после двух этапов экспансии, например, как показано на фиг. 1.

[00454] ТП могут быть собраны любым подходящим и стерильным способом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора ТП хорошо известны в данной области техники, и в настоящем процессе могут быть использованы любые такие известные способы. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают с

использованием автоматизированной системы.

[00455] Сборщики клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны из различных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. В настоящих способах может быть использован любой сборщик клеток. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или системы обработки клеток представляют собой сборщик клеток мембранного типа. В некоторых вариантах осуществления сбор клеток осуществляется с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (производимая Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому инструменту или устройству, производимому любым поставщиком, которое может перекачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, такой как вращающаяся мембрана или вращающийся фильтр, в среде в стерильной и/или закрытой системе, обеспечивая непрерывный поток и обработку клеток для удаления супернатанта или среды для культивирования клеток без образования осадка. В некоторых вариантах осуществления сборщик клеток и/или система обработки клеток могут осуществлять операции разделения клеток, промывки, замены жидкости, концентрирования и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[00456] В некоторых вариантах осуществления сбор, например, на этапе E согласно фиг. 1, проводят из биореактора с закрытой системой. В некоторых вариантах осуществления для экспансии ТП используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В некоторых вариантах осуществления один используемый биореактор представляет собой, например, G-REX -10 или G-REX -100. В некоторых вариантах осуществления биореактор с закрытой системой представляет собой один биореактор.

[00457] В некоторых вариантах осуществления этап E согласно фиг. 1 проводят в соответствии с процессами, описанными в примере G. В некоторых вариантах осуществления доступ к закрытой системе осуществляется через шприцы в стерильных условиях, чтобы не нарушать стерильность и закрытый характер системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, как описано в примере G.

[00458] В некоторых вариантах осуществления ТП собирают в соответствии со способами, описанными в примере G. В некоторых вариантах осуществления ТП между днями 1 и 11 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.5 (называемых сбором ТП на день 11 в примере G). В некоторых вариантах осуществления ТП между днями 12 и 22 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.12 (называемых сбором ТП на день 22 в примере G).

ЭТАП F. Приготовление готового препарата/перенос в пакет для инфузии

[00459] После завершения этапов с А по Е, как показано в иллюстративном порядке на фиг. 1 и как подробно описано выше и в настоящем документе, клетки переносят в контейнер для применения для введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления после получения терапевтически достаточного количества ТП с

использованием описанных выше способов экспансии ТП переносят в контейнер для применения для введения пациенту.

[00460] В одном из вариантов осуществления ТП, подвергнутые экспансии с использованием АПК согласно настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, подвергнутые экспансии с использованием МНПК согласно настоящему изобретению, могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится примерно от 30 до 60 минут. Другие подходящие способы введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический.

Необязательные компоненты клеточной среды

1. Антитела к CD3

[00461] В некоторых вариантах осуществления культуральная среда, используемая в способах экспансии, описанных в настоящем документе (включая способы экспансии, называемые REP, см., например, фиг. 1), также включает антитело к CD3. Антитело к CD3 в комбинации с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции ТП. Этот эффект может наблюдаться с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')₂, причем первые обычно являются предпочтительными; см., например, источник Tsoukas et al., J. Immunol. **1985**, 135, 1719, настоящим включенный посредством ссылки в полном объеме.

[00462] Специалистам в данной области техники будет ясно, что существует ряд подходящих антител к человеческому CD3, подходящих для использования в изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела к человеческому CD3 от различных млекопитающих, включая, не ограничиваясь перечисленным, антитела мышей, человека, приматов, крыс и собак. В частных вариантах осуществления используют антитело к CD3 ОКТ3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси или Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния).

ТАБЛИЦА 5: Аминокислотные последовательности муромонаба (пример антитела ОКТ-3)

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:1	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR
Тяжелая цепь муромонаба	PGQGLEWIGY INPSRGYTN 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180

	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSEFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNMFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

2. Агонисты 4-1BB (CD137)

[00463] В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB (CD137). Агонист 4-1BB может представлять собой любую связывающую 4-1BB молекулу, известную в данной области техники. Связывающая 4-1BB молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связываться с 4-1BB человека или млекопитающего. Агонисты 4-1BB или связывающие 4-1BB молекулы могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула может иметь как тяжелую, так и легкую цепь. В контексте настоящего документа термин «связывающая молекула» также включает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных и генетически сконструированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связываются с 4-1BB. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который является полностью человеческим антителом. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который является гуманизированным

антителом. В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела к 4-1BB, человеческие антитела к 4-1BB, мышинные антитела к 4-1BB, антитела млекопитающих к 4-1BB, моноклональные антитела к 4-1BB, поликлональные антитела к 4-1BB, химерные антитела к 4-1BB, аднектины к 4-1BB, доменные антитела к 4-1BB, одноцепочечные фрагменты к 4-1BB, фрагменты тяжелой цепи к 4-1BB, фрагменты легкой цепи к 4-1BB, слитые белки к 4-1BB и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги. Известно, что агонистические антитела к 4-1BB вызывают сильные иммунные ответы. Lee, et al., *PLOS One* **2013**, 8, e69677. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое гуманизованное или полностью человеческое моноклональное антитело (т. е. антитело, полученное из одной клеточной линии) к 4-1BB. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог.

[00464] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула также может представлять собой слитый белок. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист 4-1BB, такой как тримерный или гексамерный агонист 4-1BB (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать более высокую кластеризацию рецептора (4-1BBL) и образование внутриклеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое обычно имеет два лиганд-связывающих домена. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или имеющие более высокую валентность слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительно связывающие два или более из этих слитых белков, описаны, например, в Gieffers, et al., *Mol. Cancer Therapeutics* **2013**, 12, 2735-47.

[00465] Известно, что агонистические антитела к 4-1BB и слитые белки вызывают сильные иммунные ответы. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфически связывается с антигеном 4-1BB способом, достаточным для снижения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет антителозависимую клеточную токсичность (АЗКЦ), например, цитотоксичность НК-клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое

моноклональное антитело к 4-1BB или слитый белок, который устраняет функциональность области Fc.

[00466] В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB характеризуются связыванием с человеческим 4-1BB (SEQ ID NO:9) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с человеческим 4-1BB (SEQ ID NO:9). В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с мышинным 4-1BB (SEQ ID NO:10). Аминокислотные последовательности антигена 4-1BB, с которым связывается агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула, обобщены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6. Аминокислотные последовательности антигенов 4-1BB.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:9 человеческий 4-1BB, член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (Homo sapiens)	MGNHCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQHSF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 мышинный 4-1BB, член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (Mus musculus)	MGNHCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCKRY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSS HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTFL LALTSALLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[00467] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышинный 4-1BB с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB с K_D приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB с K_D

мышиним 4-1BB с IC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже.

[00471] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб, также известный как PF-05082566 или MOR-7480, или его фрагмент, производное, вариант или биоаналог. Утомилумаб доступен от Pfizer, Inc. Утомилумаб представляет собой иммуноглобулин G2-лямбда, *Homo sapiens* (полностью человеческое) моноклональное антитело к [*Homo sapiens* TNFRSF9 (член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), 4-1BB, Т-клеточный антиген IIA, CD137)]. Аминокислотные последовательности утомилумаба представлены в таблице ЕЕ. Утомилумаб содержит сайты гликозилирования при Asn59 и Asn292; внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) и 362-420 (C_H3); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в положениях 22'-87' (V_H-V_L) и 136'-195' (C_H1-C_L); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях изоформы IgG2A 218-218, 219-219, 222-222 и 225-225, в положениях изоформы IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 и 225-225, и в положениях изоформы IgG2B 219-130 (2), 222-222 и 225-225; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях изоформы IgG2A 130-213' (2), положениях изоформы IgG2A/B 218-213' и 130-213' и в положениях изоформы IgG2B 218-213' (2). Получение и свойства утомилумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №№ 8821867, 8337850 и 9468678, и публикации международной патентной заявки WO 2012/032433 A1, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Доклинические характеристики утомилумаба описаны в источнике Fisher, et al., *Cancer Immunolog. & Immunother.* **2012**, 61, 1721-33. Текущие клинические исследования утомилумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают идентификаторы NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 и NCT02554812 на сайте [Health clinicaltrials.gov](http://Health.clinicaltrials.gov) Национального института здравоохранения США.

[00472] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:11, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:12. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно.

В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно.

[00473] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи утомилумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, а переменная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14.

[00474] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00475] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоаналогичное агонисту 4-1BB моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на утомилумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к 4-1BB, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной

последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист 4-1BB, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист 4-1BB представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой утомилумаб.

ТАБЛИЦА 7. Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1BB, относящиеся к утомилумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:11 тяжелая цепь для утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNV 60
	SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120
	GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180
	LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240

	<p>KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS 300</p> <p>LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360</p> <p>TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420</p> <p>SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441</p>
<p>SEQ ID NO:12 легкая цепь для утомилумаба</p>	<p>SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60</p> <p>FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120</p> <p>PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTPSKQS NNKYAASSYL 180</p> <p>SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214</p>
<p>SEQ ID NO:13 вариабельная область тяжелой цепи для утомилумаба</p>	<p>EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60</p> <p>YSPSFQGGVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118</p>
<p>SEQ ID NO:14 вариабельная область легкой цепи для утомилумаба</p>	<p>SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60</p> <p>FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108</p>
<p>SEQ ID NO:15 CDR1 тяжелой цепи для утомилумаба</p>	<p>STYWIS 6</p>
<p>SEQ ID NO:16 CDR2 тяжелой цепи для утомилумаба</p>	<p>KIYPGDSYTN YSPSFQG 17</p>
<p>SEQ ID NO:17 CDR3 тяжелой цепи для</p>	<p>RGYGIFDY 8</p>

утомилумаба	
SEQ ID NO:18 CDR1 легкой цепи для утомилумаба	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO:19 CDR2 легкой цепи для утомилумаба	QDKNRPS 7
SEQ ID NO:20 CDR3 легкой цепи для утомилумаба	ATYTGFGSLA V 11

[00476] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело урелумаб, также известное как BMS-663513 и 20H4.9.h4a, или его фрагмент, производное, вариант или биоаналог. Урелумаб доступен от Bristol-Myers Squibb, Inc. и Creative Biolabs, Inc. Урелумаб представляет собой иммуноглобулин G4-каппа, Homo sapiens (полностью человеческое) моноклональное антитело к [Homo sapiens TNFRSF9 (член 9 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, 4-1BB, Т-клеточный антиген IIA, CD137)]. Аминокислотные последовательности урелумаба представлены в таблице EE. Урелумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 298 (и 298''); внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) и 368-426 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' и 368''-426''); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 136'-196' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 136'''-196'''); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях 227-227'' и 230-230''; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях 135-216' и 135''-216''''. Получение и свойства урелумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №№ 7288638 и 8962804, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Доклинические и клинические характеристики урелумаба описаны в источнике Segal, et al., Clin. Cancer Res. **2016**, доступен по ссылке <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>. Текущие клинические исследования урелумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают идентификаторы NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 и NCT01471210 на сайте Health clinicaltrials.gov Национального института здравоохранения США.

[00477] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:21, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:22. В

одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно.

[00478] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи урелумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, а переменная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24.

[00479] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00480] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоаналогичное агонисту 4-1BB моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на урелумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к 4-1BB, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист 4-1BB, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист 4-1BB представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой урелумаб.

ТАБЛИЦА 8: Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1BB,

относящиеся к урелумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:21 тяжелая цепь для урелумаба	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQS PEKLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 легкая цепь для урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYLSST 180 LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 переменная область тяжелой цепи для урелумаба	MKHLWFFLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EGGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 переменная область легкой цепи для урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110

SEQ ID NO:25 CDR1 тяжелой цепи для урелумаба	GYYSWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 тяжелой цепи для урелумаба	EINHGQYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 тяжелой цепи для урелумаба	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO:28 CDR1 легкой цепи для урелумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 CDR2 легкой цепи для урелумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 CDR3 легкой цепи для урелумаба	QQRSDWPPAL T 11

[00481] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из 1D8, 3E1or, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), ВВК2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), антитела, продуцированного линией клеток, депонированной под № ATCC HB-11248 и раскрытой в патенте США № 6974863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), антител, раскрытых в публикации заявки на патент США US 2005/0095244, антител, раскрытых в патенте США № 7288638 (таких как 20H4.9-IgG1 (BMS-663031)), антител, раскрытых в патенте США № 6887673 (таких как 4E9 или BMS-554271), антител, раскрытых в патенте США № 7214493, антител, раскрытых в патенте США № 6303121, антител, раскрытых в патенте США № 6569997, антител, раскрытых в патенте США № 6905685 (таких как 4E9 или BMS-554271), антител, раскрытых в патенте США № 6362325 (таких как 1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3E1), антител, раскрытых в

патенте США № 6974863 (таких как 53A2); антител, раскрытых в патенте США № 6210669 (таких как 1D8, 3B8 или 3E1), антител, раскрытых в патенте США № 5928893, антител, раскрытых в патенте США № 6303121, антител, раскрытых в патенте США № 6569997, антител, раскрытых в публикациях международных патентных заявок WO 2012/177788, WO 2015/119923 и WO 2010/042433, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов или биоаналогов, где содержание каждого из упомянутых выше патентов или публикаций патентных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00482] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, описанный в публикациях международных патентных заявок WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 и WO 2010/078966 A1; публикациях заявок на патент США US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 и US 2015/0126710 A1; и патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00483] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, представленный структурой I-A (слитый белок C-концевого фрагмента Fc антитела) или структурой I-B (слитый белок N-концевого фрагмента Fc антитела), или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог, как показано на фиг. 10.

[00484] В структурах I-A и I-B цилиндры относятся к отдельным связывающим доменам полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных связывающих TNFRSF домена, полученных, например, из 4-1BBL или антитела, связывающего 4-1BB, которые сворачиваются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc (включая домены C_{H3} и C_{H2}), который используется для связывания вместе двух трехвалентных белков посредством дисульфидных связей (небольшие удлиненные овалы), что стабилизирует структуру и обеспечивает агонисты, способные объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием сигнального комплекса. Связывающие TNFRSF домены, обозначенные цилиндрами, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, цепь VH и VL, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости. Может быть использована любая конструкция домена scFv, например, описанная в источниках de Marco, Microbial Cell Factories, **2011**, 10, 44; Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. **2012**, 980250; Monnier, et al., Antibodies, **2013**, 2, 193-208; или в ссылках, включенных в настоящий документ в другом месте. Структуры слитых белков этой формы описаны в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00485] Аминокислотные последовательности для других полипептидных доменов

структуры I-A приведены в таблице GG. Fc-домен предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 SEQ ID NO:31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 SEQ ID NO:31) или часть шарнирного домена (например, аминокислоты 4-16 SEQ ID NO:31). Предпочтительные линкеры для соединения С-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, включая линкеры, подходящие для слияния дополнительных полипептидов.

ТАБЛИЦА 9: Аминокислотные последовательности для слитых белков TNFRSF, включая слитые белки 4-1BB, с конструкцией слитого белка С-концевого Fc-фрагмента антитела (структура I-A).

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:31 Fc-домен	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 180 LDSGDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 линкер	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 линкер	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 линкер	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 линкер	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 линкер	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 линкер	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:38 линкер	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO:39 линкер	GGPGSSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23

SEQ ID NO:40 линкер	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO:41 линкер	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[00486] Аминокислотные последовательности для других полипептидных доменов структуры I-B приведены в таблице HH. Если фрагмент Fc антитела слит с N-концом слитого белка к TNFRSF, как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, и линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов осуществления, представленных в SEQ ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

ТАБЛИЦА 10: Аминокислотные последовательности для слитых белков к TNFRSF, включая слитые белки к 4-1BB, с конструкцией слитого белка N-концевого Fc-фрагмента антитела (структура I-B).

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:42 Fc-домен	METDTLLLVV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO:43 линкер	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 линкер	SSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 линкер	SSSSSGSGS GSGSGS 16

[00487] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, выбранных из группы, состоящей из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи урелумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из вариабельных областей тяжелой цепи и

вариабельных областей легкой цепи, описанных в таблице GG, любой комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из вышеуказанных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[00488] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:46. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность растворимого 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:47.

[00489] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям V_H и V_L , представленным в таблице 11, где домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 11: Дополнительные полипептидные домены, подходящие в качестве связывающих 4-1BB доменов в слитых белках или в качестве scFv-антител-агонистов 4-1BB.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:46	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL
4-1BBL	LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120

	<p>TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RRVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180</p> <p>LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240</p> <p>TPEIPAGLPS PRSE 254</p>
<p>SEQ ID NO:47 растворимый домен 4-1BBL</p>	<p>LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSALTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60</p> <p>LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLV PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120</p> <p>SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168</p>
<p>SEQ ID NO:48 вариабельная область тяжелой цепи для 4B4-1- 1 версии 1</p>	<p>QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60</p> <p>NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118</p>
<p>SEQ ID NO:49 вариабельная область легкой цепи для 4B4-1- 1 версии 1</p>	<p>DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60</p> <p>RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107</p>
<p>SEQ ID NO:50 вариабельная область тяжелой цепи для 4B4-1- 1 версии 2</p>	<p>QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60</p> <p>NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119</p>
<p>SEQ ID NO:51 вариабельная область легкой цепи для 4B4-1- 1 версии 2</p>	<p>DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60</p> <p>RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108</p>
<p>SEQ ID NO:52 вариабельная область тяжелой цепи для H39E3-</p>	<p>MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60</p> <p>GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120</p>

2	
SEQ ID NO:53 вариабельная область легкой цепи для H39E3- 2	MEAPAQLLFL LLLWLPTDTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00490] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, содержащий (i) первый растворимый связывающий 4-1BB домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий 4-1BB домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий 4-1BB домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, и где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, содержащий (i) первый растворимый связывающий 4-1BB домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий 4-1BB домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий 4-1BB домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, причем в каждом из растворимых доменов к 4-1BB отсутствует стеблевая область (которая способствует тримеризации и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью связывающего 4-1BB домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот.

[00491] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист 4-1BB, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина из надсемейства факторов некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, где в каждом из растворимых доменов цитокина из надсемейства TNF отсутствует стеблевая область, и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот, и где каждый домен цитокина из надсемейства TNF является связывающим 4-1BB доменом.

[00492] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое scFv-антитело к 4-1BB, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H , связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L .

[00493] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB BPS Bioscience, № по каталогу 79097-2, коммерчески доступное от BPS Bioscience, Сан-Диего, Калифорния, США. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB Creative Biolabs, № по каталогу MOM-18179, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Ширли, Нью-Йорк,

США.

3. Агонисты OX40 (CD134)

[00494] В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист OX40 (CD134). Агонист OX40 может представлять собой любую связывающую OX40 молекулу, известную в данной области техники. Связывающая OX40 молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связываться с OX40 человека или млекопитающего. Агонисты OX40 или связывающие OX40 молекулы могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Агонист OX40 или связывающая OX40 молекула может иметь как тяжелую, так и легкую цепь. В контексте настоящего документа термин «связывающая молекула» также включает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, продуцируемые библиотекой экспрессии Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленных и генетически сконструированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связываются с OX40. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который является полностью человеческим антителом. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела к OX40, человеческие антитела к OX40, мышинные антитела к OX40, антитела млекопитающих к OX40, моноклональные антитела к OX40, поликлональные антитела к OX40, химерные антитела к OX40, аднектины к OX40, доменные антитела к OX40, одноцепочечные фрагменты к OX40, фрагменты тяжелой цепи к OX40, фрагменты легкой цепи к OX40, слитые белки к OX40 и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (т. е. антитело, полученное из одной клеточной линии) к OX40.

[00495] В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 или связывающая OX40 молекула также может представлять собой слитый белок. Слитые белки OX40, содержащие Fc-домен, слитый с OX40L, описаны, например, в источнике Sadun, et al., *J. Immunother.* **2009**, 182, 1481-89. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист OX40, такой как тримерный или гексамерный агонист OX40 (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать более высокую кластеризацию рецептора (OX40L) и образование внутриклеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим

моноклональным антителом, которое обычно имеет два лиганд-связывающих домена. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или имеющие более высокую валентность слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительно связывающие два или более из этих слитых белков, описаны, например, в Gieffers, et al., *Mol. Cancer Therapeutics* **2013**, 12, 2735-47.

[00496] Известно, что агонистические антитела к OX40 и слитые белки вызывают сильные иммунные ответы. Curti, et al., *Cancer Res.* **2013**, 73, 7189-98. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфически связывается с антигеном OX40 способом, достаточным для снижения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет антителозависимую клеточную токсичность (АЗКЦ), например, цитотоксичность NK-клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое моноклональное антитело к OX40 или слитый белок, который устраняет функциональность области Fc.

[00497] В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 характеризуются связыванием с человеческим OX40 (SEQ ID NO:54) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с человеческим OX40 (SEQ ID NO:54). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с мышинным OX40 (SEQ ID NO:55). Аминокислотные последовательности антигена OX40, с которым связывается агонист OX40 или связывающая OX40 молекула, обобщены в таблице 12.

ТАБЛИЦА 12: Аминокислотные последовательности антигенов OX40.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:54 человеческий OX40 (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60
	NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120
	PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240

	RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSTGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60
мышинный OX40	HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120
(Mus musculus)	VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180
	TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

[00498] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 60 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 50 пМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 40 пМ или ниже, или связывает человеческий или мышинный OX40 с K_D приблизительно 30 пМ или ниже.

[00499] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно 9×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, или связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{assoc} приблизительно 1×10^6 1/М·с или быстрее.

[00500] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc} приблизительно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc} приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным OX40 с k_{dissoc}

приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с k_{dissoc} приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с k_{dissoc} приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с k_{dissoc} приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с k_{dissoc} приблизительно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с k_{dissoc} приблизительно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

[00501] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист ОХ40, который связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 10 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 9 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 8 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 7 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 6 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 5 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 4 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 3 нМ или ниже, связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 2 нМ или ниже, или связывается с человеческим или мышинным ОХ40 с IC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже.

[00502] В некоторых вариантах осуществления агонист ОХ40 представляет собой таволиксизумаб, также известный как MEDI0562 или MEDI-0562. Таволиксизумаб доступен от MedImmune - дочерней компании AstraZeneca, Inc. Таволиксизумаб представляет собой иммуноглобулин G1-каппа, гуманизированное и химерное антитело к [Homo sapiens TNFRSF4 (член 4 надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), ОХ40, CD134)]. Аминокислотные последовательности таволиксизумаба представлены в таблице КК. Таволиксизумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 301 и 301'', с фукозилированными комплексными биантенными гликанами типа CHO; внутрицепочечные дисульфидные мостики в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H - V_L), 148-204 (C_H1 - C_L), 265-325 (C_H2) и 371-429 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' и 371''-429''); внутрицепочечные дисульфидные мостики в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H - V_L) и 134'-194' (C_H1 - C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 134'''-194'''); межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелыми цепями в положениях 230-230'' и 233-233''; и межцепочечные дисульфидные мостики между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях 224-214' и 224''-214''''. Текущие клинические исследования таволиксизумаба при различных солидных опухолях включают идентификаторы NCT02318394 и NCT02705482 на сайте Health clinicaltrials.gov Национального института здравоохранения США.

[00503] В одном из вариантов осуществления агонист ОХ40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:56, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:57. В одном из вариантов осуществления агонист ОХ40 содержит тяжелую и легкую цепи,

имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно.

[00504] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи таволиксизумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:58, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:59, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59.

[00505] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 и SEQ ID NO:65, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00506] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на таволиксизумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой таволиксизумаб.

ТАБЛИЦА 13: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к таволиксизумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:56 тяжелая цепь для таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTL ^{SL} TCAVYGG ^{SFS} SGYWNWIRKH PGK ^{GLE} YIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQ ^{YSL} QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAM ^{DY} WGQGT ^{LV} TVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSK ^{STS} GGTAALG ^{CLV} KDYFPEP ^{VTV} SWNSGALTSG VHTFPAVL ^{QS} 180 SGLYSLSSV ^V TVPSSSLGT ^Q TYICNVN ^{HKP} SNTKVDK ^{RVE} PKSCDKTHTC PPCAPEL ^{LG} 240 GPSVFLFPPK PKDTLMIS ^{RT} PEVTCVV ^{VDV} SHEDPEV ^{KFN} WYVDGVEV ^{VHN} AKTKPREE ^{QY} 300 NSTYRVVSVL TVLHQD ^{WLNG} KEYKCKV ^{SNK} ALPAIEK ^{TI} SKAKGQPREP QVYTLPP ^{SRE} 360 EMTKNQV ^{SLT} CLVKG ^{FYPSD} IAVEWES ^{NGQ} PENNYKT ^{TPP} VLSDGSFFL YSKLTV ^{DKSR} 420 WQQGNVF ^{FSCS} VMHEALHN ^{HY} TQKSLSL ^{SPG} K 451
SEQ ID NO:57 легкая цепь для таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDR ^{VT} ITCRASQ ^{DIS} NYLNWYQ ^{QKP} GKAPKLLI ^{YY} TSKLHSG ^{VPS} 60 RFSGSGSG ^{TD} YTLTISS ^{LQP} EDFATYYC ^{QQ} GSALPWTF ^{GQ} GTKVEIK ^{RTV} AAPSVFI ^{FPP} 120 SDEQLKSG ^{TA} SVVCLLN ^{NFY} PREAKVQ ^{WKV} DNALQSG ^{NSQ} ESVTEQDS ^{KD} STYSLSS ^{TLT} 180 LSKADYEK ^{HK} VYACEV ^{THQG} LSSPVTK ^{SFN} RGEC 214
SEQ ID NO:58 вариабельная область тяжелой цепи для таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTL ^{SL} TCAVYGG ^{SFS} SGYWNWIRKH PGK ^{GLE} YIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQ ^{YSL} QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAM ^{DY} WGQGT ^{LV} T 118
SEQ ID NO:59 вариабельная область легкой цепи для таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDR ^{VT} ITCRASQ ^{DIS} NYLNWYQ ^{QKP} GKAPKLLI ^{YY} TSKLHSG ^{VPS} 60 RFSGSGSG ^{TD} YTLTISS ^{LQP} EDFATYYC ^{QQ} GSALPWTF ^{GQ} GTKVEIK ^R 108
SEQ ID NO:60	GSFSSGYWN 9

CDR1 тяжелой цепи для таволиксизумаба	
SEQ ID NO:61 CDR2 тяжелой цепи для таволиксизумаба	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 CDR3 тяжелой цепи для таволиксизумаба	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 CDR1 легкой цепи для таволиксизумаба	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 CDR2 легкой цепи для таволиксизумаба	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 CDR3 легкой цепи для таволиксизумаба	QQGSALPW 8

[00507] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 11D4, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 11D4 описаны в патентах США №№ 7960515, 8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 11D4 представлены в таблице LL.

[00508] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:66, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:67. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в

SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно.

[00509] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи 11D4. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:68, а переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:69, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно.

[00510] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:72, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:75, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00511] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на 11D4. В одном из вариантов

осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 11D4.

ТАБЛИЦА 14: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к 11D4.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:66	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA
тяжелая цепь	PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60
для 11D4	ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES
	GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120
	TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN

	SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO:67 легкая цепь для 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 переменная область тяжелой цепи для 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 переменная область легкой цепи для 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 CDR1 тяжелой цепи для 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 CDR2 тяжелой цепи для 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 CDR3 тяжелой цепи для 11D4	ESGWYLFDY 9

SEQ ID NO:73 CDR1 легкой цепи для 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 CDR2 легкой цепи для 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 CDR3 легкой цепи для 11D4	QQYNSYPPT 9

[00512] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 18D8, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 18D8 описаны в патентах США №№ 7960515, 8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 18D8 представлены в таблице MM.

[00513] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:76, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:77. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно.

[00514] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи 18D8. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, а вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:79,

и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно.

[00515] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00516] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на 18D8. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным

средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой 18D8.

ТАБЛИЦА 15: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к 18D8.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:76 тяжелая цепь для 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:77 легкая цепь для 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE

	SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 вариабельная область тяжелой цепи для 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 вариабельная область легкой цепи для 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 тяжелой цепи для 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO:81 CDR2 тяжелой цепи для 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO:82 CDR3 тяжелой цепи для 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO:83 CDR1 легкой цепи для 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:84 CDR2 легкой цепи для 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO:85 CDR3 легкой цепи для 18D8	QQRSNWPT 8

[00517] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu119-122, которое представляет собой гуманизованное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu119-122 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации международной патентной заявки WO 2012/027328, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu119-122 представлены в таблице NN.

[00518] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи Hu119-122. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:86, а переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:87, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно.

[00519] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:90, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 и SEQ ID NO:93, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00520] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на Hu119-122. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся

предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист ОХ40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. Антитело-агонист ОХ40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu119-122.

ТАБЛИЦА 16: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов ОХ40, относящиеся к Hu119-122.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:86 вариабельная область тяжелой цепи для Hu119- 122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS 120
SEQ ID NO:87 вариабельная область легкой цепи для Hu119- 122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 тяжелой цепи для Hu119- 122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 тяжелой	AINSDGGSTY YPDTMER 17

цепи для Hu119-122	
SEQ ID NO:90 CDR3 тяжелой цепи для Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 CDR1 легкой цепи для Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMН 15
SEQ ID NO:92 CDR2 легкой цепи для Hu119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 CDR3 легкой цепи для Hu119-122	QHSRELPLT 9

[00521] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu106-222, которое представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu106-222 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации международной патентной заявки WO 2012/027328, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu106-222 представлены в таблице 00.

[00522] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи Hu106-222. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:94, а переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:95, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID

NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно.

[00523] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97 и SEQ ID NO:98, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:101, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены.

[00524] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоаналогичное агонисту OX40 моноклональное антитело, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на Nu106-222. В одном из вариантов осуществления биоаналогичное моноклональное антитело включает антитело к OX40, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Nu106-222. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело-агонист OX40, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Nu106-222. Антитело-агонист OX40 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Nu106-222. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая

дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой Hu106-222.

ТАБЛИЦА 17: Аминокислотные последовательности для антител-агонистов OX40, относящиеся к Hu106-222.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:94 вариабельная область тяжелой цепи для Hu106- 222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:95 вариабельная область легкой цепи для Hu106- 222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCKASQDVS TAVAWYQQK PKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 тяжелой цепи для Hu106- 222	DYSMH 5
SEQ ID NO:97 CDR2 тяжелой цепи для Hu106- 222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 CDR3 тяжелой цепи для Hu106- 222	PYYDYVSYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 легкой цепи для Hu106- 222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100	SASYLYT 7

CDR2 легкой цепи для Hu106-222	
SEQ ID NO:101 CDR3 легкой цепи для Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00525] В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист OX40 представляет собой MEDI6469 (также называемое 9B12). MEDI6469 представляет собой мышинное моноклональное антитело. Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой антитело, продуцируемое гибридомой 9B12, депонированной в Biovest Inc. (Малверн, Массачусетс, США), как описано в источнике Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585, содержание которого настоящим включено посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности CDR MEDI6469. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи MEDI6469.

[00526] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой L106 BD (Pharmingen, продукт №340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела L106 (BD Pharmingen, продукт №340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела L106 (BD Pharmingen, продукт №340420). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, № по каталогу 20073). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой мышинное моноклональное антитело к mCD134/mOX40 (клон OX86), коммерчески доступное от InVivoMAb, BioXcell Inc, Вест Лебанон, Нью-Гэмпшир.

[00527] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 выбран из агонистов OX40, описанных в публикациях международных патентных заявок WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 и WO 2014/148895; Европейской патентной заявке EP 0672141; публикациях заявок на патент США US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 и US 2015/132288 (включая клоны 20E5 и 12H3); и патентах США №№ 7504101, 7550140, 7622444, 7696175, 7960515,

7961515, 8133983, 9006399 и 9163085, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00528] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой слитый белок-агонист OX40, представленный структурой I-A (слитый белок C-концевого фрагмента Fc антитела) или структурой I-B (слитый белок N-концевого фрагмента Fc антитела), или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. Свойства структур I-A и I-B описаны выше и в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности для полипептидных доменов структуры I-A приведены в таблице GG. Fc-домен предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 SEQ ID NO:31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 SEQ ID NO:31) или часть шарнирного домена (например, аминокислоты 4-16 SEQ ID NO:31). Предпочтительные линкеры для соединения C-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, включая линкеры, подходящие для слияния дополнительных полипептидов. Аминокислотные последовательности для других полипептидных доменов структуры I-B приведены в таблице HH. Если фрагмент Fc антитела слит с N-концом слитого белка к TNRFSF, как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, и линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов осуществления, представленных в SEQ ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

[00529] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, выбранных из группы, состоящей из вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи таволиксизумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 11D4, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 18D8, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи Hu119-122, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи Hu106-222, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи, описанных в таблице OO, любой комбинации вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи из вышеуказанных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[00530] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:102. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40,

соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность растворимого OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:103. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:104.

[00531] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична показанным последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям V_H и V_L , представленным в таблице 18, где домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 18: Дополнительные полипептидные домены, подходящие в качестве связывающих OX40 доменов в слитых белках (например, структурах I-A и I-B) или в качестве scFv-антител-агонистов OX40.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 растворимый домен OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYSQE 60 VNLSLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 растворимый домен OX40L (альтернативный)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVT DNTSLDDFHV NGGELILHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 вариабельная область тяжелой цепи для 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTSLTVS 120
SEQ ID NO:106 вариабельная область легкой цепи для 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 вариабельная область тяжелой цепи для 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTSLTVSSA 120
SEQ ID NO:108 вариабельная область легкой цепи для 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQYYNHP TTFGQGTK 108

SEQ ID NO:109 вариабельная область тяжелой цепи для 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGLTVTVS 120
SEQ ID NO:110 вариабельная область легкой цепи для 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 вариабельная область тяжелой цепи для 023	EVQLVESGGG LVHPPGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGLTVTVSS 120
SEQ ID NO:112 вариабельная область легкой цепи для 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 вариабельная область легкой цепи	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 вариабельная область легкой цепи	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 вариабельная	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60

область тяжелой цепи гуманизованного антитела	ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNE D TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 вариабельная область тяжелой цепи гуманизованного антитела	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWV RQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGT TTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 вариабельная область легкой цепи гуманизованного антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 вариабельная область легкой цепи гуманизованного антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 вариабельная область тяжелой цепи гуманизованного антитела	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 вариабельная область тяжелой цепи гуманизованного антитела	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGMVTVSS 120
SEQ ID NO:123 вариабельная область легкой цепи гуманизованного антитела	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QKPGQPPKL LIYLA SNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 вариабельная область легкой цепи гуманизованного антитела	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QKPGQAPRL LIYLA SNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 вариабельная область тяжелой цепи	MYLGLNYVFI VLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV

	YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 вариабельная область легкой цепи	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00532] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, содержащий (i) первый растворимый связывающий OX40 домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий OX40 домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий OX40 домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, и где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, содержащий (i) первый растворимый связывающий OX40 домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий OX40 домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий OX40 домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, причем в каждом из растворимых связывающих OX40 доменов отсутствует стеблевая область (которая способствует тримеризации и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью связывающего OX40 домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот.

[00533] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой одноцепочечный слитый полипептид-агонист OX40, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина из надсемейства факторов некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина из надсемейства TNF, где в каждом из растворимых доменов цитокина из надсемейства TNF отсутствует стеблевая область, и первый и второй пептидные линкеры независимо друг от друга имеют длину 3-8 аминокислот, и где домен цитокина из надсемейства TNF является связывающим OX40 доменом.

[00534] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой MEDI6383. MEDI6383 представляет собой слитый белок-агонист OX40 и может быть получен, как описано в патенте США № 6312700, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00535] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое scFv-антитело к OX40, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H,

связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L .

[00536] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело-агонист Creative Biolabs OX40 MOM-18455, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Inc., Ширли, Нью-Йорк, США.

[00537] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой клон Ver-ACT35 агонистического антитела к OX40, коммерчески доступный от BioLegend, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США.

Необязательный анализ жизнеспособности клеток

[00538] Необязательно, после первой экспансии (иногда называемой начальной общей экспансией) может быть проведен анализ жизнеспособности клеток с использованием стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, на образце общей массы TIL может быть проведен анализ по вытеснению трипанового синего, который избирательно маркирует мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. Другие анализы для использования в тестировании жизнеспособности могут включать, не ограничиваясь перечисленным, анализ Alamar blue; и анализ МТТ.

1. Подсчет клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00539] В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессия маркеров, таких как, не ограничиваясь перечисленным, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, может быть измерена методом проточной цитометрии с антителами, например, не ограничиваясь перечисленным, коммерчески доступными от BD Bio-sciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) с использованием проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки могут быть подсчитаны вручную с использованием одноразового гемоцитометра с-chip (VWR, Батавия, Иллинойс), а жизнеспособность может быть оценена любым способом, известным в данной области техники, включая, не ограничиваясь перечисленным, окрашивание трипановым синим. Жизнеспособность клеток также может быть проанализирована на основании USSN 15/863,634, включенного в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00540] В некоторых случаях общая масса TIL может быть сразу же криоконсервирована с использованием протоколов, обсуждаемых ниже. В качестве альтернативы, общая масса TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервирована, как обсуждается ниже. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные TIL будут применяться в терапии, общая масса или популяции REP TIL могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки.

[00541] Согласно настоящему изобретению предложен способ анализа TIL на жизнеспособность и/или возможность дальнейшего применения для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ анализа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) включает:

(i) получение первой популяции TIL;

(ii) проведение первой экспансии путем культивирования указанной первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей П-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ТП; и

(iii) проведение второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции ТП добавок П-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (АПК) с получением третьей популяции ТП, где указанная третья популяция ТП по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная вторая популяция ТП;

(iv) сбор, промывку и криоконсервацию указанной третьей популяции ТП;

(v) хранение криоконсервированных ТП при криогенной температуре;

(vi) размораживание указанной третьей популяции ТП с получением размороженной третьей популяции ТП; и

(vii) проведение дополнительной второй экспансии части размороженной третьей популяции ТП путем добавления в среду для культивирования клеток указанной третьей популяции П-2, ОКТ-3 и АПК в течение дополнительного периода экспансии (иногда называемого периодом reREP), составляющего по меньшей мере 3 дня, причем третью экспансию проводят для получения четвертой популяции ТП, причем количество ТП в указанной четвертой популяции ТП сравнивают с количеством ТП в указанной третьей популяции ТП для получения соотношения;

(viii) определение на основе указанного соотношения с этапа (vii), подходит ли размороженная популяция ТП для введения пациенту;

(ix) введение пациенту терапевтически эффективной дозы размороженной третьей популяции ТП, если было определено, что соотношение количества ТП в указанной четвертой популяции ТП и количества ТП в указанной третьей популяции ТП превышает 5:1 на этапе (viii).

[00542] В некоторых вариантах осуществления ТП оценивают на жизнеспособность после этапа (vii).

[00543] Настоящее изобретение также относится к дополнительным способам анализа ТП. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложен способ анализа ТП, включающий:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных ТП;

(ii) размораживание части указанной первой популяции криоконсервированных ТП;

(iii) проведение первой экспансии путем культивирования части указанной первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей П-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), в течение дополнительного периода экспансии (иногда называемого периодом reREP), составляющего по меньшей мере 3 дня, с получением второй популяции ТП, где часть из указанной первой популяции ТП сравнивают с указанной второй популяцией ТП для получения соотношения количества ТП, где соотношение количества ТП в указанной второй популяции ТП и количества ТП в части указанной первой популяции ТП превышает 5:1;

(iv) определение на основе указанного соотношения с этапа (iii), подходит ли указанная первая популяция ТП для применения для терапевтического введения пациенту;

(v) определение, что указанная первая популяция ТП подходит для применения для терапевтического введения, когда определенное соотношение количества ТП в указанной второй популяции ТП и количества ТП в указанной первой популяции ТП превышает 5:1 на этапе (iv).

[00544] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества ТП в указанной второй популяции ТП и количества ТП в части указанной первой популяции ТП превышает 50:1.

[00545] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение экспансии всей первой популяции криоконсервированных ТП с этапа (i) в соответствии со способами, описанными в любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

[00546] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных ТП с этапа (i).

2. Клеточные культуры

[00547] В одном из вариантов осуществления способ экспансии ТП, включая описанный выше, а также проиллюстрированный на фиг. 1, может включать применение от приблизительно 5 000 мл до приблизительно 25 000 мл клеточной среды, от приблизительно 5 000 мл до приблизительно 10 000 мл клеточной среды или от приблизительно 5 800 мл до приблизительно 8 700 мл клеточной среды. В некоторых вариантах осуществления среда представляет собой бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления среда для первой экспансии является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления среда для второй экспансии является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления среда как для первой экспансии, так и для второй экспансии является бессывороточной. В одном из вариантов осуществления для увеличения количества ТП используют не более одного типа среды для культивирования клеток. Может быть использована любая подходящая среда для культивирования клеток, например, клеточная среда AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфата и 10 мкМ гентамицина сульфата) для культивирования клеток (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В этом отношении способы согласно изобретению обладают преимуществом, состоящим в том, что они позволяют уменьшить количество среды и количество типов сред, необходимых для увеличения количества ТП. В одном из вариантов осуществления увеличение количества ТП может включать подпитку клеток не чаще, чем раз в три или четыре дня. Увеличение количества клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для увеличения количества клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для экспансии клеток.

[00548] В одном из вариантов осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефилтрованной. Использование

нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для увеличения количества клеток. В одном из вариантов осуществления клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME).

[00549] В одном из вариантов осуществления продолжительность способа включает получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование указанного образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду; получение TIL из указанного образца опухолевой ткани; увеличение количества TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, в течение приблизительно от 7 до 14 дней, например, приблизительно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления pre-REP составляет приблизительно от 7 до 14 дней, например, приблизительно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления REP составляет приблизительно от 7 до 14 дней, например, приблизительно 11 дней.

[00550] В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры использовали для экспансии TIL с использованием МНПК с помощью способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в публикации заявки на патент США № 2005/0106717 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии в газопроницаемых пакетах. В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии с использованием системы экспансии клеток, которая позволяет проводить экспансию TIL в газопроницаемых пакетах, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления TIL подвергают экспансии с использованием системы экспансии клеток, которая позволяет проводить экспансию TIL в газопроницаемых пакетах, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления система экспансии клеток включает газопроницаемый пакет для клеток объемом, выбранным из группы, состоящей из приблизительно 100 мл, приблизительно 200 мл, приблизительно 300 мл, приблизительно 400 мл, приблизительно 500 мл, приблизительно 600 мл, приблизительно 700 мл, приблизительно 800 мл, приблизительно 900 мл, приблизительно 1 л, приблизительно 2 л, приблизительно 3 л, приблизительно 4 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л и приблизительно 10 л.

[00551] В одном из вариантов осуществления TIL могут быть подвергнуты экспансии в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют клеточным популяциям увеличиваться в численности от приблизительно 5×10^5 клеток/см² до от 10×10^6 до 30×10^6 клеток/см². В одном из вариантов осуществления это осуществляется без подпитки. В одном из вариантов осуществления это осуществляется без подпитки, при условии, что высота среды в колбе G-Rex составляет приблизительно 10 см. В одном из вариантов осуществления это

осуществляется без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления цитокин может быть добавлен в виде болуса без необходимости смешивать цитокин со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и использовались для экспансии ТП, и включают описанные в публикации заявки на патент США US 2014/0377739A1, публикации международной патентной заявки WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США US 2013/0115617 A1, публикации международной патентной заявки WO 2013/188427 A1, публикации заявки на патент США US 2011/0136228 A1, патенте США US 8809050 B2, публикации международной патентной заявки WO 2011/072088 A2, публикации заявки на патент США US 2016/0208216 A1, публикации заявки на патент США US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки WO 2012/129201 A1, публикации заявки на патент США 2013/0102075 A1, патенте США US 8956860 B2, публикации международной патентной заявки WO 2013/173835 A1, публикации заявки на патент США US 2015/0175966 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие процессы также описаны в источнике Jin et al., *J. Immunotherapy*, **2012**, 35:283-292.

Необязательная генетическая модификация ТП

[00552] В некоторых вариантах осуществления ТП необязательно генетически модифицируют для включения дополнительных функций, в том числе, не ограничиваясь перечисленным, высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), например, TCR, нацеленного на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерного антигенного рецептора (CAR), связывающегося с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или линейно-специфической молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

Необязательная криоконсервация ТП

[00553] Как обсуждалось выше и проиллюстрировано на этапах от А до Е, представленных на фиг. 1, криоконсервация может происходить в ряде моментов на протяжении процесса экспансии ТП. В некоторых вариантах осуществления подвергнутая экспансии популяция ТП после второй экспансии (как предусмотрено, например, в соответствии с этапом D на фиг. 1) может быть криоконсервирована. Криоконсервацию обычно проводят путем помещения популяции ТП в замораживающий раствор, например, 85% сыворотки группы АВ с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры, охлаждаемые газообразным азотом, для криоконсервации. См. Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления изобретения ТП криоконсервируют в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ТП криоконсервируют в среде для культивирования клеток плюс 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ТП криоконсервируют в соответствии со способами, приведенными в примерах F и G.

[00554] При необходимости клетки удаляют из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не разморозится примерно 4/5 раствора. Клетки обычно повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ТП могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность, как это известно в данной области техники.

Закрытые системы для производства ТП

[00555] Настоящее изобретение предусматривает применение закрытых систем в процессе культивирования ТП. Такие закрытые системы позволяют предотвратить и/или уменьшить микробиологическое загрязнение, позволяют использовать меньшее количество колб и позволяют снизить затраты. В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используются два контейнера.

[00556] Такие закрытые системы хорошо известны в данной области техники, и их можно найти, например, по ссылке <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> и <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

[00557] Стерильные соединительные устройства (STCD) обеспечивают стерильные соединения между двумя частями системы трубок. Эта процедура обеспечивает стерильное соединение различных контейнеров и трубок разных диаметров. В некоторых вариантах осуществления закрытые системы включают в себя системы с соединением по типу Луер-Лок (Luer Lock) и запаянные системы, как описано, например, в примере G. В некоторых вариантах осуществления доступ к закрытой системе осуществляется через шприцы в стерильных условиях, чтобы не нарушать стерильность и закрытый характер системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, как описано в примере G. В некоторых вариантах осуществления из ТП получают контейнер с готовым продуктом в соответствии со способом, описанным в примере G, раздел «Приготовление готового препарата и заполнение».

[00558] В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используется один контейнер с момента получения фрагментов опухоли до момента, когда ТП будут готовы для введения пациенту или криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, первый контейнер представляет собой закрытый G-контейнер, и популяцию ТП центрифугируют и переносят в пакет для инфузии без открытия первого закрытого G-контейнера. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, пакет для инфузии представляет собой пакет для инфузии, содержащий НуроThermosol. Закрытая система или закрываемая система культивирования ТП-клеток характеризуется тем, что после добавления образца опухоли и/или фрагментов опухоли систему герметично закрывают снаружи для образования закрытой среды, свободной от проникновения бактерий, грибов и/или любого другого микробиологического загрязнения.

[00559] В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического

загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 100%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 95%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 10% до приблизительно 90%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет от приблизительно 15% до приблизительно 85%. В некоторых вариантах осуществления снижение микробиологического загрязнения составляет приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%.

[00560] Закрытая система позволяет ТП расти в отсутствие и/или при значительно сниженном микробиологическом загрязнении.

[00561] Более того, все из рН, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода среды для культивирования ТП-клеток варьируются по мере культивирования клеток. Следовательно, даже несмотря на то, что среда, подходящая для клеточной культуры, циркулирует, тем не менее, необходимо постоянно поддерживать закрытую среду как оптимальную среду для пролиферации ТП. С этой целью желательно, чтобы физические факторы рН, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода в культуральной жидкости в закрытой среде контролировались с помощью датчика, сигнал которого используется для управления газообменником, установленным на входе в культуральную среду, и парциальное давление этого газа в закрытой среде регулировалось в реальном времени в соответствии с изменениями в культуральной жидкости, чтобы оптимизировать среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предложена закрытая система для культивирования клеток, которая включает на входе в закрытую среду газообменник, оборудованный контролирующим устройством, которое измеряет рН, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода в закрытой среде и оптимизирует среду, в которой культивируются клетки, автоматически регулируя концентрации газов на основе сигналов от контролирующего устройства.

[00562] В некоторых вариантах осуществления давление в закрытой среде регулируется непрерывно или периодически. То есть, давление в закрытой среде можно изменять, например, с помощью устройства для поддержания давления, чтобы пространство подходило для роста ТП в состоянии положительного давления, или для способствования экссудации жидкости в состоянии отрицательного давления и тем самым способствования пролиферации клеток. Кроме того, периодически применяя

отрицательное давление, можно равномерно и эффективно заменять циркулирующую жидкость в закрытой среде за счет временного сокращения объема закрытой среды.

[00563] В некоторых вариантах осуществления оптимальные компоненты культуры для пролиферации ТП могут быть заменены или добавлены, и могут быть добавлены такие факторы, как П-2 и/или ОКТЗ, а также их комбинация.

Необязательная криоконсервация ТП

[00564] Либо общая популяция ТП, либо подвергнутая экспансии популяция ТП может быть необязательно криоконсервирована. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении терапевтической популяции ТП. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении ТП, собранных после второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию осуществляют в отношении ТП на иллюстративном этапе F на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления ТП криоконсервируют в пакете для инфузии. В некоторых вариантах осуществления ТП криоконсервируют перед помещением в пакет для инфузии. В некоторых вариантах осуществления ТП криоконсервируют и не помещают в пакет для инфузии. В некоторых вариантах осуществления криоконсервацию проводят с использованием среды для криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО). Обычно ее осуществляют путем помещения популяции ТП в замораживающий раствор, например, 85% сыворотки группы АВ с инактивированным компонентом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры, охлаждаемые газообразным азотом, для криоконсервации. См. Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986.

[00565] При необходимости клетки удаляют из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не разморозится примерно 4/5 раствора. Клетки обычно повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ТП могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность, как это известно в данной области техники.

[00566] В предпочтительном варианте осуществления популяцию ТП криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). В предпочтительном варианте осуществления популяцию ТП криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО). В предпочтительном варианте осуществления популяцию ТП криоконсервируют с использованием CS10 и среды для культивирования клеток в соотношении 1:1 (об.:об.). В предпочтительном варианте осуществления популяцию ТП криоконсервируют с использованием CS10 и среды для культивирования клеток в соотношении 1:1 (об.:об.), дополнительно содержащих добавку П-2.

[00567] Как обсуждалось выше на этапах с А по Е, криоконсервация может

происходить в ряде моментов на протяжении процесса экспансии ТП. В некоторых вариантах осуществления общая популяция ТП после первой экспансии согласно этапу В или повергнутая экспансии популяция ТП после одной или более вторых экспансий согласно этапу D может быть криоконсервирована. Криоконсервацию обычно проводят путем помещения популяции ТП в замораживающий раствор, например, 85% сыворотки группы АВ с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C с необязательным переносом в морозильные камеры, охлаждаемые газообразным азотом, для криоконсервации. См. Sadeghi, et al., Acta Oncologica **2013**, 52, 978-986.

[00568] При необходимости клетки удаляют из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не разморозится примерно 4/5 раствора. Клетки обычно повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ТП могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность, как это известно в данной области техники.

[00569] В некоторых случаях популяция ТП с этапа В может быть сразу же криоконсервирована с использованием протоколов, обсуждаемых ниже. В качестве альтернативы, общая популяция ТП может быть подвергнута этапу С и этапу D, а затем криоконсервирована после этапа D. Аналогичным образом, в случае, когда генетически модифицированные ТП будут применяться в терапии, популяции ТП с этапа В или этапа D могут быть подвергнуты генетическим модификациям для подходящей обработки.

Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

[00570] В одном из вариантов осуществления ТП, подвергнутые экспансии с использованием способов согласно настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, подвергнутые экспансии с использованием МНПК согласно настоящему изобретению, могут быть введены любым подходящим способом, известным в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится примерно от 30 до 60 минут. Другие подходящие способы введения включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение.

[00571] Может быть введена любая подходящая доза ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$ ТП, в среднем около $7,8 \times 10^{10}$ ТП, в частности, если рак представляет собой НМРЛ. В одном из вариантов осуществления вводят от приблизительно $1,2 \times 10^{10}$ до приблизительно $4,3 \times 10^{10}$ ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления вводят от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} ТП. В

1×10^9 до приблизительно 40×10^9 ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 30×10^9 ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 20×10^9 ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 10×10^9 ТП. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 1×10^9 до приблизительно 5×10^9 ТП.

[00573] В некоторых вариантах осуществления количество ТП, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В одном из вариантов осуществления количество ТП, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 , от 1×10^9 до 5×10^9 , от 5×10^9 до 1×10^{10} , от 1×10^{10} до 5×10^{10} , от 5×10^{10} до 1×10^{11} , от 5×10^{11} до 1×10^{12} , от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13} .

[00574] В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет менее, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[00575] В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет более 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%,

0,0002% или 0,0001%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[00576] В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет от приблизительно 0,0001% до приблизительно 50%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 40%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 29%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 28%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 27%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 26%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 24%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 23%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 22%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 21%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 19%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 18%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 17%, от приблизительно 0,6% до приблизительно 16%, от приблизительно 0,7% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,8% до приблизительно 14%, от приблизительно 0,9% до приблизительно 12% или от приблизительно 1% до приблизительно 10%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[00577] В некоторых вариантах осуществления концентрация ТП в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 4,5%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 3,5%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 2%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 1%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,9%, мас./мас., мас./об. или об./об., фармацевтической композиции.

[00578] В некоторых вариантах осуществления количество ТП, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, равно или меньше 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

[00579] В некоторых вариантах осуществления количество ТП, содержащееся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет более 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г,

0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[00580] ТП, содержащиеся в фармацевтических композициях согласно изобретению, эффективны в широком диапазоне дозировок. Точная дозировка будет зависеть от способа введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, подлежащего лечению, а также предпочтений и опыта лечащего врача. При необходимости также могут быть использованы клинически установленные дозировки ТП. Количества фармацевтических композиций, вводимые с использованием описанных в настоящем документе способов, такие как дозировки ТП, будут зависеть от человека или млекопитающего, подвергаемого лечению, тяжести расстройства или состояния, скорости введения, распределения активных фармацевтических ингредиентов и мнения лечащего врача.

[00581] В некоторых вариантах осуществления ТП могут быть введены посредством однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления ТП могут быть введены посредством многократных доз. Введение доз может осуществляться один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Введение доз может осуществляться один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или один раз в два дня. Введение ТП может продолжаться столько, сколько необходимо.

[00582] В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка ТП составляет приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка ТП составляет от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 , от 1×10^9 до 5×10^9 , от 5×10^9 до 1×10^{10} , от 1×10^{10} до 5×10^{10} , от 5×10^{10} до 1×10^{11} , от 5×10^{11} до 1×10^{12} , от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13} .

[00583] В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка ТП составляет от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 4,3 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,2 мг/кг, от приблизительно 0,35 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 2,15 мг/кг, от приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 1,3 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 1,15

мг/кг, от приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,55 мг/кг до приблизительно 0,85 мг/кг, от приблизительно 0,65 мг/кг до приблизительно 0,8 мг/кг, от приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 0,75 мг/кг, от приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 2,15 мг/кг, от приблизительно 0,85 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1,85 мг/кг, от приблизительно 1,15 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, от приблизительно 1,3 мг/кг до приблизительно 1,6 мг/кг, от приблизительно 1,35 мг/кг до приблизительно 1,5 мг/кг, от приблизительно 2,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, от приблизительно 2,3 мг/кг до приблизительно 3,4 мг/кг, от приблизительно 2,4 мг/кг до приблизительно 3,3 мг/кг, от приблизительно 2,6 мг/кг до приблизительно 3,15 мг/кг, от приблизительно 2,7 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 2,8 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг или от приблизительно 2,85 мг/кг до приблизительно 2,95 мг/кг.

[00584] В некоторых вариантах осуществления эффективная дозировка ТП составляет от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 45 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 40 мг, от приблизительно 15 мг до приблизительно 35 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 30 мг, от приблизительно 23 мг до приблизительно 28 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 60 мг до приблизительно 140 мг, от приблизительно 70 мг до приблизительно 130 мг, от приблизительно 80 мг до приблизительно 120 мг, от приблизительно 90 мг до приблизительно 110 мг, или от приблизительно 95 мг до приблизительно 105 мг, от приблизительно 98 мг до приблизительно 102 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 160 мг до приблизительно 240 мг, от приблизительно 170 мг до приблизительно 230 мг, от приблизительно 180 мг до приблизительно 220 мг, от приблизительно 190 мг до приблизительно 210 мг, от приблизительно 195 мг до приблизительно 205 мг, или от приблизительно 198 до приблизительно 207 мг.

[00585] Эффективное количество ТП может быть введено либо посредством однократной, либо посредством многократных доз любым из принятых способов введения агентов, имеющих схожее назначение, включая интраназальный и трансдермальный способы, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, путем трансплантации или путем ингаляции.

Способы лечения пациентов

[00586] Способы лечения начинают с первоначального сбора ТП и культивирования ТП. Способы осуществления обоих процессов описаны в данной области техники, например, в источнике Jin et al., J. Immunotherapy, **2012**, 35(3):283-292, включенном в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Варианты

осуществления способов лечения описаны в следующих разделах, включая раздел примеров.

[00587] Подвергнутые экспансии ТП, полученные в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, в том числе, например, как описано на этапах с А по F выше или в соответствии с этапами с А по F выше (также как показано, например, на фиг. 1), являются особенно подходящими для лечения пациентов с раком (например, как описано в источнике Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239, а также в дополнительном материале; включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления ТП выращивали из резецированного материала метастатической меланомы, как описано ранее (см. источник Dudley, et al., *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342; включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). Свежая опухоль может быть подвергнута диссекции в стерильных условиях. Может быть взят репрезентативный образец для формального патоморфологического исследования. Могут быть использованы отдельные фрагменты размером от 2 мм³ до 3 мм³. В некоторых вариантах осуществления берут 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 20, 25 или 30 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 20, 22, 24, 26 или 28 образцов на пациента. В некоторых вариантах осуществления берут 24 образца на пациента. Образцы могут быть помещены в отдельные лунки 24-луночного планшета, поддерживаться в среде для выращивания с высокой дозой ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) и контролироваться на предмет разрушения опухоли и/или пролиферации ТП. Любая опухоль с жизнеспособными клетками, оставшимися после обработки, может быть подвергнута ферментативному гидролизу с получением суспензии отдельных клеток и заморожена, как описано в настоящем документе.

[00588] В некоторых вариантах осуществления образец успешно выращенных ТП может быть взят для анализа фенотипа (CD3, CD4, CD8 и CD56) и протестирован против аутологичной опухоли, если таковая имеется. ТП можно считать реактивными, если совместное культивирование в течение ночи дало уровни интерферона гамма (IFN- γ) > 200 пг/мл и в два раза выше фона. (Goff, et al., *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847; включен в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме). В некоторых вариантах осуществления культуры с признаками аутологичной реактивности или достаточной динамики роста могут быть выбраны для второй экспансии (например, второй экспансии в соответствии с этапом D на фиг. 1), включая вторые экспансии, иногда называемые быстрой экспансией (REP). В некоторых вариантах осуществления подвергнутые экспансии ТП с высокой аутологичной реактивностью (например, высокой степенью пролиферации во время второй экспансии), выбирают для дополнительной второй экспансии. В некоторых вариантах осуществления ТП с высокой аутологичной реактивностью (например, высокой степенью пролиферации во время второй экспансии, как представлено на этапе D на фиг. 1), выбирают для дополнительной второй экспансии в соответствии с этапом D на фиг. 1.

[00589] Клеточные фенотипы криоконсервированных образцов ТП из пакета для инфузии могут быть проанализированы с помощью проточной цитометрии (например, FlowJo) на предмет поверхностных маркеров CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любым из описанных в настоящем документе способов. Сывороточные цитокины измеряли с помощью стандартных методов твердофазного иммуноферментного анализа. Повышение уровня IFN-гамма в сыворотке было определено как >100 пг/мл и превышающее 4-3 исходных уровня.

[00590] В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1, обеспечивают неожиданное улучшение клинической эффективности ТП. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1, демонстрируют повышенную клиническую эффективность по сравнению с ТП, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от проиллюстрированных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления способы, отличные от описанных в настоящем документе, включают способы, называемые процессом 1С и/или поколением 1 (Gen 1). В некоторых вариантах осуществления повышенную эффективность измеряют с помощью ЧКЗ, ЧОО и/или других клинических ответов. В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, проиллюстрированными на фиг. 1, демонстрируют аналогичное время до достижения ответа и профиль безопасности по сравнению с ТП, полученными способами, отличными от описанных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от проиллюстрированных на фиг. 1, например, процесс Gen 1.

[00591] В некоторых вариантах осуществления IFN-гамма (IFN- γ) свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ в крови субъектов, получающих ТП, свидетельствует о наличии активных ТП. В некоторых вариантах осуществления используют определение содержания действующего вещества по продукции IFN- γ . Продукция IFN- γ является еще одним показателем цитотоксического потенциала. Продукция IFN- γ может быть измерена путем определения уровней цитокина IFN- γ в крови, сыворотке или ТП *ex vivo* у субъекта, получающего ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления увеличение IFN- γ свидетельствует об эффективности лечения у пациента, получающего ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ увеличен в один, два, три, четыре или пять или более раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в один раз по сравнению с

пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в три раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в четыре раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в пять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ измеряют с использованием набора для ELISA от Quantikine. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ измеряют в ТП *ex vivo* у субъекта, получающего ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ измеряют в крови субъекта, получающего ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ измеряют в сыворотке субъекта, получающего ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1.

[00592] В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1, демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с ТП, полученными другими способами, включая способы, не проиллюстрированные на фиг. 1, такие как, например, способы, называемые способами процесса 1С. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение поликлональности может свидетельствовать об эффективности лечения в отношении введения ТП, полученных способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один, два, десять,

100, 500 или 1000 раз по сравнению с ТП, полученными с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в десять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1.

[00593] Показатели эффективности могут включать в себя частоту контроля заболевания (ЧКЗ), а также общую частоту ответа (ОЧО), как известно в данной области техники, а также описано в настоящем документе.

1. Способы лечения НМРЛ

[00594] Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способе лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), где НМРЛ является рефрактерным к лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 включает, например, не ограничиваясь перечисленным, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), ипилимумаб (Yervoy®), гуманизированное антитело к PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное антитело к PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (mAb к PD-1 CT-011, Medivation), моноклональное антитело к PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитело к PD-1 SHR-1210

(ShangHai HengRui), человеческое моноклональное антитело REGN2810 (Regeneron), человеческое моноклональное антитело MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизированное антитело IgG4 к PD-1 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления антитело к PD-1 происходит из клона: RMP1-14 (крысиный IgG) - BioXcell, № по каталогу BP0146. Другими подходящими антителами, подходящими для использования в способах, включающих совместное введение с TIL, полученными в соответствии с этапами с А по F, как описано в настоящем документе, являются антитела к PD-1, раскрытые в патенте США № 8008449, включенном в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, тем самым повышая иммунную активность. Сюда входят любые антитела, известные в данной области техники, которые связываются с PD-L1 и нарушают взаимодействие между PD-1 и PD-L1, и стимулируют противоопухолевый иммунный ответ. Например, антитела, нацеленные на PD-L1 и проходящие клинические исследования, включают BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие подходящие антитела, нацеленные на PD-L1, раскрыты в патенте США № 7943743, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Специалисту будет ясно, что сюда входит любое антитело, которое связывается с PD-1 или PD-L1, нарушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ.

[00595] В некоторых вариантах осуществления НМРЛ подвергался лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления НМРЛ подвергался лечению антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект с НМРЛ не подвергался лечению. В некоторых вариантах осуществления НМРЛ не подвергался лечению антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления НМРЛ не подвергался лечению антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления НМРЛ ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления НМРЛ ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но больше не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с НМРЛ не подвергался лечению антителами к PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект с НМРЛ имеет низкую экспрессию PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с НМРЛ имеет НМРЛ, не подвергавшийся лечению, или прошел химиотерапевтическое лечение, но не подвергался лечению антителами к PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с НМРЛ имеет НМРЛ, не подвергавшийся лечению, или прошел химиотерапевтическое лечение, но не подвергался лечению антителами к PD-1/PD-L1 и имеет низкую экспрессию PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект с НМРЛ имеет массивное поражение на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет массивное поражение на исходном уровне и имеет низкую экспрессию PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с НМРЛ имеет НМРЛ, не подвергавшийся лечению, или подвергавшийся химиотерапевтическому

лечению, но не подвергавшийся лечению антителами к PD-1/PD-L1, имеет низкую экспрессию PD-L1 и/или имеет массивное поражение на исходном уровне. В некоторых вариантах осуществления массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости. В некоторых вариантах осуществления массивное поражение относится к случаям, где наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтический препарат включает препарат стандарта медицинской помощи при НМРЛ.

[00596] В некоторых вариантах осуществления ТП, полученные способами согласно настоящему изобретению, включая описанные, например, на фиг. 1, демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с ТП, полученными другими способами, включая способы, не проиллюстрированные на фиг. 1, такие как, например, способы, называемые способами процесса 1С. В некоторых вариантах осуществления значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность свидетельствует об эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления увеличение поликлональности может свидетельствовать об эффективности лечения в отношении введения ТП, полученных способами согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один, два, десять, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с ТП, полученными с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в один раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в десять раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 500 раз по сравнению с пациентом, не

получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1. В некоторых вариантах осуществления поликлональность увеличена в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим ТП, полученные с использованием способов, отличных от предложенных в настоящем документе, включая, например, способы, отличные от воплощенных на фиг. 1.

[00597] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии или IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному). В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному). В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, подлежащий лечению, имеет онкоген-зависимую опухоль и получал по меньшей мере одну эффективную таргетную терапию, нацеленную на онкоген.

[00598] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии или IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее подвергался лечению, например, ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как, например, антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая, например, антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая, например, антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая антитело к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая антитело к PD-1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ III стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет НМРЛ IV стадии (плоскоклеточный, аденокарциному, крупноклеточную карциному) и ранее получал системную терапию, включая антитело к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, подлежащий лечению, имеет онкоген-зависимую опухоль и получал по меньшей мере одну эффективную таргетную терапию, нацеленную на онкоген.

[00599] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению,

имеет гистологически или патоморфологически подтвержденный диагноз НМРЛ III стадии или IV стадии (плоскоклеточного, аденокарциномы, крупноклеточной карциномы).

[00600] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект, подлежащий лечению, не получал иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, мог получить до 3 предшествующих системных противоопухолевых терапий, включая, например, системную терапию в адьювантном или неоадьювантном режиме или как часть радикальной химиолучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет мутации онкогена, включая, например, мутации в EGFR, ALK и/или ROS.

[00601] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, ранее получал системную терапию, например, ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как, например, антитело к PD-1 и/или антитело к PD-L1, как часть ≤ 3 предшествующих линий системной терапии. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, имеет мутации онкогена, включая, например, мутации в EGFR, ALK и/или ROS.

[00602] В некоторых вариантах осуществления у субъекта, подлежащего лечению, имеется по меньшей мере 1 резектабельный очаг поражения (или совокупные очаги поражения) размером по меньшей мере приблизительно 1,5 см в диаметре после резекции для использования для получения ТП.

[00603] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, прошел период отмывки от одной или более предшествующих противоопухолевых терапий минимальной продолжительности до первого исследуемого лечения (т. е. до начала немиелоаблативной лимфодеплеции (NMA-LD) или пембролизумаба)

[00604] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, ранее получал таргетную терапию агентами, нацеленными на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), MEK, BRAF, ALK, ROS1 и/или другие мишени (включая, например, эрлотиниб, афатиниб, дакомитиниб, осимертиниб, кризотиниб, церитиниб и/или лорлатиниб), и прошел минимальную отмывку от предшествующего лечения в течение по меньшей мере 14 дней до начала лечения ТП.

[00605] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, получал адьювантную, неоадьювантную или радикальную химиотерапию и/или химиолучевую терапию и прошел минимальную отмывку от предшествующего лечения в течение по меньшей мере 21 дня до начала лечения.

[00606] В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению, ранее получал терапию, нацеленную на иммунные контрольные точки, например, ингибитором PD-1 или ингибитором PD-L1, таким как, например, антитело к PD-1 и антитело к PD-L1, другими моноклональными антителами и/или вакцинами, и прошел минимальный период отмывки, больший или равный 21 дню до начала немиелоаблативной лимфодеплеции (NMA-LD).

Ингибиторы PD-1 и PD-L1

[0001] Программируемая клеточная смерть 1 (PD-1) представляет собой трансмембранный белок рецептора иммунной контрольной точки, состоящий из 288 аминокислот, экспрессируемый Т-клетками, В-клетками, естественными киллерными (NK) Т-клетками, активированными моноцитами и дендритными клетками. PD-1, также известный как CD279, принадлежит к семейству CD28 и у человека кодируется геном *Pdcd1* на 2-й хромосоме. PD-1 состоит из одного домена надсемейства иммуноглобулинов (Ig), трансмембранной области и внутриклеточного домена, содержащего иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) и иммунорецепторный тирозиновый переключающий мотив (ITSM). PD-1 и его лиганды (PD-L1 и PD-L2), как известно, играют ключевую роль в иммунной толерантности, как описано в Keir, et al., *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, 26, 677-704. PD-1 обеспечивает ингибирующие сигналы, которые негативно регулируют Т-клеточные иммунные ответы. PD-L1 (также известный как B7-H1 или CD274) и PD-L2 (также известный как B7-DC или CD273) экспрессируются на опухолевых клетках и стромальных клетках, с которыми могут встречаться активированные Т-клетки, экспрессирующие PD-1, что приводит к иммуносупрессии Т-клеток. PD-L1 представляет собой трансмембранный белок из 290 аминокислот, кодируемый геном *Cd274* на 9-й хромосоме человека. Блокирование взаимодействия между PD-1 и его лигандами PD-L1 и PD-L2 с помощью ингибитора PD-1, ингибитора PD-L1 и/или ингибитора PD-L2 может преодолеть иммунную резистентность, как показано в последних клинических исследованиях, таких как описанные в источнике Toralian, et al., *N. Eng. J. Med.* **2012**, 366, 2443-54. PD-L1 экспрессируется на многих линиях опухолевых клеток, тогда как PD-L2 экспрессируется в основном на дендритных клетках и нескольких линиях опухолевых клеток. Помимо Т-клеток (которые индуцибельно экспрессируют PD-1 после активации), PD-1 также экспрессируется на В-клетках, естественных киллерах, макрофагах, активированных моноцитах и дендритных клетках.

[0002] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 может представлять собой любой ингибитор PD-1 или блокатор PD-1, известный в данной области техники. В частности, он представляет собой один из ингибиторов или блокаторов PD-1, более подробно описанных в следующих абзацах. Термины «ингибитор», «антагонист» и «блокатор» используются в настоящем документе взаимозаменяемо по отношению к ингибиторам PD-1. Во избежание неопределенности ссылки на ингибитор PD-1, представляющий собой антитело, в настоящем документе могут относиться к соединению или его антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, конъюгатам или биоаналогам. Во избежание неопределенности ссылки на ингибитор PD-1 в настоящем документе могут также относиться к низкомолекулярному соединению или его фармацевтически приемлемой соли, сложному эфиру, сольвату, гидрату, сокристаллу или пролекарству.

[0003] В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело (т. е. антитело к PD-1), его фрагмент, включая фрагменты Fab, или его

одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой поликлональное антитело. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 конкурирует за связывание с PD-1 и/или связывается с эпитопом на PD-1. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание с PD-1 и/или связывается с эпитопом на PD-1.

[0004] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 60 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 50 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 40 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 30 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 20 пМ или ниже, связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 10 пМ или ниже, или связывает человеческий PD-1 с K_D приблизительно 1 пМ или ниже.

[0005] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно 9×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, или связывается с человеческим PD-1 с k_{assoc} приблизительно 1×10^6 1/М·с или быстрее.

[0006] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

[0007] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ингибитор, который блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или

человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 10 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 9 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 8 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 7 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 6 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 5 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 4 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 3 нМ или ниже, блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 2 нМ или ниже, или блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC₅₀ приблизительно 1 нМ или ниже.

[0008] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб (коммерчески доступен как OPDIVO от Bristol-Myers Squibb Co.) или его биоаналоги, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Ниволумаб представляет собой полностью человеческое антитело IgG4, блокирующее рецептор PD-1. В одном из вариантов осуществления антитело к PD-1 представляет собой иммуноглобулин G4 каппа, антитело к человеческому CD274. Ниволумабу присвоен регистрационный номер 946414-94-4 в Химической реферативной службе (CAS), и он также известен как 5C4, BMS-936558, MDX-1106 и ONO-4538. Получение и свойства ниволумаба описаны в патенте США № 8008449 и в публикации международной патентной заявки WO 2006/121168, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая безопасность и эффективность ниволумаба при различных формах рака описаны в источниках Wang, et al., *Cancer Immunol Res.* **2014**, 2, 846-56; Page, et al., *Ann. Rev. Med.*, **2014**, 65, 185-202; и Weber, et al., *J. Clin. Oncology*, **2013**, 31, 4311-4318, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности ниволумаба представлены в таблице 48. Ниволумаб имеет дисульфидные связи в тяжелой цепи в положениях 22-96, 140-196, 254-314, 360-418, 22"-96", 140"-196", 254"-314" и 360"-418"; дисульфидные связи в легкой цепи в положениях 23'-88', 134'-194', 23'''-88''' и 134'''-194'''; дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепями в положениях 127-214', 127"-214"', дисульфидные связи между тяжелыми цепями в положениях 219-219" и 222-222"; и сайты N-гликозилирования (H CH₂ 84,4) в положениях 290, 290".

[0009] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:463, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:128. В

одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:463 и SEQ ID NO:128, соответственно.

[0010] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи ниволумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:129, а переменная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:130, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:129 и SEQ ID NO:130, соответственно.

[0011] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит домены

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:131, SEQ ID NO:132 и SEQ ID NO:133, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:135 и SEQ ID NO:136, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и любое из вышеупомянутых антител.

[0012] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой биоаналогичное моноклональное антитело к PD-1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на ниволумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналог включает антитело к PD-1, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело к PD-1, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело к PD-1 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой ниволумаб. Антитело к PD-1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой ниволумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой ниволумаб.

ТАБЛИЦА 19. Аминокислотные последовательности ингибиторов PD-1,

относящиеся к ниволумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:463 тяжелая цепь ниволумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRY Y 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGT LVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKD YFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTYTCNV DH KPSNTKVDKR VESKYGPPCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
SEQ ID NO:128 легкая цепь ниволумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRL LIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:129 переменная область тяжелой цепи ниволумаба	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRY Y 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGT LVT VSS 113
SEQ ID NO:130 переменная область легкой цепи ниволумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRL LIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
SEQ ID NO:131 CDR1 тяжелой	NSGMH 5

цепи ниволумаба	
SEQ ID NO:132 CDR2 тяжелой цепи ниволумаба	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
SEQ ID NO:133 CDR3 тяжелой цепи ниволумаба	NDDY 4
SEQ ID NO:134 CDR1 легкой цепи ниволумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:135 CDR2 легкой цепи ниволумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:136 CDR3 легкой цепи ниволумаба	QQSSNWPRT 9

[0013] В еще одном варианте осуществления ингибитор PD-1 включает пембролизумаб (коммерчески доступен как KEYTRUDA от Merck & Co., Inc., Кенилворт, Нью-Джерси, США) или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Пембролизумабу присвоен регистрационный номер CAS 1374853-91-4, и он также известен как ламбролизумаб, МК-3475 и SCH-900475. Пембролизумаб имеет структуру иммуноглобулина G4, анти-(человеческий белок PDCD1 (программируемая клеточная смерть 1)) (моноклональная тяжелая цепь человека и *Mus musculus*), дисульфида с димером моноклональной легкой цепи человека и *Mus musculus*. Структура пембролизумаба также может быть описана как иммуноглобулин G4, анти-(программируемая клеточная смерть 1 человека); гуманизованная мышьяная моноклональная [228-L-пролин(H10-S>P)] γ 4 тяжелая цепь (134-218')-дисульфид с димером гуманизованной моноклональной легкой мышьяной к-цепи (226-226":229-229"^c)-бисдисульфида. Свойства, применения и получение пембролизумаба описаны в публикации международной патентной заявки WO 2008/156712 A1, патенте США № 8354509 и публикациях заявок на патент США US 2010/0266617 A1, US 2013/0108651 A1 и US 2013/0109843 A2, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая безопасность и эффективность пембролизумаба при различных формах рака описаны в источниках Fuerst, *Oncology Times*, **2014**, 36, 35-36; Robert, et al., *Lancet*, **2014**, 384, 1109-17; и Thomas, et al., *Exp. Opin. Biol. Ther.*, **2014**, 14, 1061-1064. Аминокислотные последовательности пембролизумаба представлены в таблице 49. Пембролизумаб включает следующие дисульфидные мостики: 22-96, 22"-96",

23'-92', 23'''-92''', 134-218', 134''-218''', 138'-198', 138'''-198''', 147-203, 147''-203'', 226-226'', 229-229'', 261-321, 261''-321'', 367-425 и 367''-425'', и следующие сайты гликозилирования (N): Asn-297 и Asn-297''. Пембролизумаб представляет собой изотип IgG4/каппа со стабилизирующей мутацией S228P в области Fc; вставка этой мутации в шарнирную область IgG4 предотвращает образование полумолекул, обычно наблюдаемое для антител IgG4. Пембролизумаб гетерогенно гликозилирован при Asn297 в Fc-домене каждой тяжелой цепи, что обеспечивает молекулярную массу приблизительно 149 кДа для интактного антитела. Доминирующей гликоформой пембролизумаба является фукозилированная форма агалакто диантенного гликана (G0F).

[0014] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:137, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:138. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:137 и SEQ ID NO:138, соответственно.

[0015] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи пембролизумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:139, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:140, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична

последовательностям, представленным в SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:139 и SEQ ID NO:140, соответственно.

[0016] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142 и SEQ ID NO:143, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:144, SEQ ID NO:145 и SEQ ID NO:146, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-1, что и любое из вышеупомянутых антител.

[0017] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой биоаналогичное моноклональное антитело к PD-1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на пембролизумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналог включает антитело к PD-1, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело к PD-1, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело к PD-1 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой пембролизумаб. Антитело к PD-1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или

более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой пембролизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой пембролизумаб.

ТАБЛИЦА 20. Аминокислотные последовательности ингибиторов PD-1, относящиеся к пембролизумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:137 тяжелая цепь пембролизумаба	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV 240 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY 300 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK 360 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG 420 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK 447
SEQ ID NO:138 легкая цепь пембролизумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL LIYLAAYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF 120 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSLS 180 STLTLKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGEC 218

SEQ ID NO:139 вариабельная область тяжелой цепи пембролизумаба	QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYMYWVRQA PGQGLEWMGG INPSNGGTNF 60 NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS 120
SEQ ID NO:140 вариабельная область легкой цепи пембролизумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQKPGQAPRL LIYLASYLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:141 CDR1 тяжелой цепи пембролизумаба	NYMY 5
SEQ ID NO:142 CDR2 тяжелой цепи пембролизумаба	GINPSNGGTN FNEKFK 16
SEQ ID NO:143 CDR3 тяжелой цепи пембролизумаба	RDYRFDMGFD Y 11
SEQ ID NO:144 CDR1 легкой цепи пембролизумаба	RASKGVSTSG YSYLH 15
SEQ ID NO:145 CDR2 легкой цепи пембролизумаба	LASYLES 7
SEQ ID NO:146 CDR3 легкой цепи пембролизумаба	QHSRDLPLT 9

[0018] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело к PD-1, такое как клоны к m-PD-1 J43 (№ по каталогу BE0033-2) и RMP1-14 (№ по каталогу BE0146) (Bio X Cell, Inc., Вест Лебанон, Нью-Гэмпшир, США). Ряд коммерчески доступных антител к PD-1 известен

специалисту в данной области техники.

[0019] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело, раскрытое в патенте США № 8354509 или в публикациях заявок на патент США №№ 2010/0266617 A1, 2013/0108651 A1, 2013/0109843 A2, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1, описанное в патентах США №№ 8287856, 8580247 и 8168757, и в публикациях заявок на патент США №№ 2009/0028857 A1, 2010/0285013 A1, 2013/0022600 A1 и 2011/0008369 A1, содержание которых настоящим включено посредством ссылки. В еще одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой антитело к PD-1, раскрытое в патенте США № 8735553 B1, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пидилизумаб, также известный как СТ-011, который описан в патенте США № 8686119, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[0020] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-1 может представлять собой малую молекулу или пептид, или производное пептида, такие как описанные в патентах США №№ 8907053, 9096642 и 9044442 и публикации заявки на патент США US 2015/0087581; 1,2,4-оксадиазольные соединения и производные, такие как описанные в публикации заявки на патент США № 2015/0073024; циклические пептидомиметические соединения и производные, такие как описанные в публикации заявки на патент США US 2015/0073042; циклические соединения и производные, такие как описанные в публикации заявки на патент США US 2015/0125491; 1,3,4-оксадиазольные и 1,3,4-тиадиазольные соединения и производные, такие как описанные в публикации международной патентной заявки WO 2015/033301; соединения и производные на основе пептидов, такие как описанные в публикациях международных патентных заявок WO 2015/036927 и WO 2015/04490, или соединения и производные на основе макроциклических пептидов, такие как описанные в публикации заявки на патент США US 2014/0294898; содержание всего вышеперечисленного настоящим включено посредством ссылки в полном объеме.

[0021] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 может представлять собой любой ингибитор, антагонист или блокатор PD-L1 или PD-L2, известный в данной области техники. В частности, он представляет собой один из ингибиторов, антагонистов или блокаторов PD-L1 или PD-L2, более подробно описанных в следующих абзацах. Термины «ингибитор», «антагонист» и «блокатор» используются в настоящем документе взаимозаменяемо по отношению к ингибиторам PD-L1 и PD-L2. Во избежание неопределенности ссылки на ингибитор PD-L1 или PD-L2, представляющий собой антитело, в настоящем документе могут относиться к соединению или его антигенсвязывающим фрагментам, вариантам, конъюгатам или биоаналогам. Во избежание неопределенности ссылки на ингибитор PD-L1 или PD-L2 в настоящем документе могут относиться к соединению или его фармацевтически приемлемой соли,

сложному эфиру, сольвату, гидрату, сокристаллу или пролекарству.

[0022] В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе композиции, процессы и способы включают ингибитор PD-L1 или PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой малую молекулу. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой антитело (т. е. антитело к PD-1), его фрагмент, включая фрагменты Fab, или его одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой поликлональное антитело. В предпочтительном варианте осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 или PD-L2 конкурирует за связывание с PD-L1 или PD-L2 и/или связывается с эпитопом на PD-L1 или PD-L2. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание с PD-L1 или PD-L2 и/или связывается с эпитопом на PD-L1 или PD-L2.

[0023] В некоторых вариантах осуществления ингибиторы PD-L1, предложенные в настоящем документе, являются селективными в отношении PD-L1, поскольку соединения связываются или взаимодействуют с PD-L1 при значительно более низких концентрациях, чем те, при которых они связываются или взаимодействуют с другими рецепторами, включая рецептор PD-L2. В отдельных вариантах осуществления соединения связываются с рецептором PD-L1 с константой связывания, которая составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза более высокую концентрацию, приблизительно в 3 раза более высокую концентрацию, приблизительно в 5 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 10 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 20 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 30 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 50 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 100 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 200 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 300 раз более высокую концентрацию или приблизительно в 500 раз более высокую концентрацию, чем для рецептора PD-L2.

[0024] В некоторых вариантах осуществления ингибиторы PD-L2, предложенные в настоящем документе, являются селективными в отношении PD-L2, поскольку соединения связываются или взаимодействуют с PD-L2 при значительно более низких концентрациях, чем те, при которых они связываются или взаимодействуют с другими рецепторами, включая рецептор PD-L1. В некоторых вариантах осуществления соединения связываются с рецептором PD-L2 с константой связывания, которая составляет по меньшей мере приблизительно в 2 раза более высокую концентрацию, приблизительно в 3 раза более высокую концентрацию, приблизительно в 5 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 10 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 20 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 30 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 50 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 100 раз более высокую концентрацию, приблизительно в 200 раз более

высокую концентрацию, приблизительно в 300 раз более высокую концентрацию или приблизительно в 500 раз более высокую концентрацию, чем для рецептора PD-L1.

[0025] Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что опухолевые клетки экспрессируют PD-L1, а Т-клетки экспрессируют PD-1. Однако экспрессия PD-L1 опухолевыми клетками не требуется для эффективности ингибиторов или блокаторов PD-1 или PD-L1. В одном из вариантов осуществления опухолевые клетки экспрессируют PD-L1. В еще одном варианте осуществления опухолевые клетки не экспрессируют PD-L1. В некоторых вариантах осуществления способы могут включать комбинацию антитела к PD-1 и к PD-L1, таких как описанные в настоящем документе, в комбинации с TIL. Введение комбинации антитела к PD-1 и к PD-L1 и TIL может быть одновременным или последовательным.

[0026] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 100 пМ или ниже, связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 90 пМ или ниже, связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 80 пМ или ниже, связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 70 пМ или ниже, связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 60 пМ или ниже, K_D приблизительно 50 пМ или ниже, связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 40 пМ или ниже, или связывает человеческий PD-L1 и/или PD-L2 с K_D приблизительно 30 пМ или ниже.

[0027] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно 9×10^5 1/М·с или быстрее, связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с и/или быстрее, или связывается с человеческим PD-L1 и/или PD-L2 с k_{assoc} приблизительно 1×10^6 1/М·с или быстрее.

[0028] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который связывается с человеческим PD-L1 или PD-L2 с k_{dissoc} приблизительно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-1 с k_{dissoc} приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывается с человеческим PD-L1 или PD-L2 с k_{dissoc} приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывается с человеческим PD-L1 или PD-L2 с k_{dissoc} приблизительно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

[0029] В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 и/или PD-L2 представляет собой ингибитор, который блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 10 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 9 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 8 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 7 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 6 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 5 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 4 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 3 нМ или ниже; блокирует или ингибирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 2 нМ или ниже; или блокирует человеческий PD-1, или блокирует связывание человеческого PD-L1 или человеческого PD-L2 с человеческим PD-1 с IC_{50} приблизительно 1 нМ или ниже.

[0030] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой дурвалумаб, также известный как MEDI4736 (который коммерчески доступен от Medimmune, LLC, Гейтерсберг, Мэриленд, дочерней компании AstraZeneca plc.), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, раскрытое в патенте США № 8779108 или в публикации заявки на патент США № 2013/0034559, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Клиническая эффективность дурвалумаба описана в источниках Page, et al., *Ann. Rev. Med.*, **2014**, 65, 185-202; Brahmer, et al., *J. Clin. Oncol.* **2014**, 32, 5s (приложение, реферат 8021); и McDermott, et al., *Cancer Treatment Rev.*, **2014**, 40, 1056-64. Получение и свойства дурвалумаба описаны в патенте США № 8779108, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности дурвалумаба представлены в таблице 50. Моноклональное антитело дурвалумаб включает дисульфидные связи в положениях 22-96, 22"-96", 23'-89', 23"'-89'", 135'-195', 135"'-195'", 148-204, 148"-204", 215'-224, 215"'-224", 230-230", 233-233", 265-325, 265"-325", 371-429 и 371"-429'; и сайты N-гликозилирования в положениях Asn-301 и Asn-301".

[0031] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:147, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:148. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab,

одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:147 и SEQ ID NO:148, соответственно.

[0032] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи дурвалумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:149, а переменная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:150, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:149 и SEQ ID NO:150, соответственно.

[0033] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:151, SEQ ID NO:152 и SEQ ID NO:153, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие

последовательности, представленные в SEQ ID NO:154, SEQ ID NO:155 и SEQ ID NO:156, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

[0034] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой биоаналогичное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на дурвалумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналог включает антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой дурвалумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело к PD-L1 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой дурвалумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой дурвалумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой дурвалумаб.

ТАБЛИЦА 21. Аминокислотные последовательности ингибиторов PD-L1, относящиеся к дурвалумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
---------------	--

<p>SEQ ID NO:147 тяжелая цепь дурвалумаба</p>	<p>EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEAFDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASIETTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451</p>
<p>SEQ ID NO:148 легкая цепь дурвалумаба</p>	<p>EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSTL TLSKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC 265</p>
<p>SEQ ID NO:149 вариабельная область тяжелой цепи дурвалумаба</p>	<p>EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEAFDY WGQGTLVTVS 120 S 121</p>
<p>SEQ ID NO:150 вариабельная область легкой цепи дурвалумаба</p>	<p>EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108</p>
<p>SEQ ID NO:151</p>	<p>RYWMS 5</p>

CDR1 тяжелой цепи дурвалумаба	
SEQ ID NO:152 CDR2 тяжелой цепи дурвалумаба	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
SEQ ID NO:153 CDR3 тяжелой цепи дурвалумаба	EGGWFGELAF DY 12
SEQ ID NO:154 CDR1 легкой цепи дурвалумаба	RASQRVSSSY LA 12
SEQ ID NO:155 CDR2 легкой цепи дурвалумаба	DASSRAT 7
SEQ ID NO:156 CDR3 легкой цепи дурвалумаба	QQYGSLPWT 9

[0035] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой авелумаб, также известный как MSB0010718C (коммерчески доступен от Merck KGaA/EMD Serono), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. Получение и свойства авелумаба описаны в публикации заявки на патент США US 2014/0341917 A1, содержание которой специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности авелумаба представлены в таблице 51. Авелумаб имеет дисульфидные связи в тяжелой цепи (C23-C104) в положениях 22-96, 147-203, 264-324, 370-428, 22"-96", 147"-203", 264"-324" и 370"-428"; дисульфидные связи в легкой цепи (C23-C104) в положениях 22'-90', 138'-197', 22'''-90''' и 138'''-197'''; дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепью (h 5-CL 126) в положениях 223-215' и 223'''-215'''; дисульфидные связи между тяжелыми цепями (h 11, h 14) в положениях 229-229" и 232-232"; сайты N-гликозилирования (H CH₂ N84,4) в положениях 300, 300"; фукозилированные сложные биантеннарные гликаны типа CHO; и усечение C-концевого лизина H CHS K2 в положениях 450 и 450'.

[0036] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:157, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:158. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи,

имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:157 и SEQ ID NO:158, соответственно.

[0037] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепи авелумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:159, а вариабельная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:160, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:159 и SEQ ID NO:160, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:159 и SEQ ID NO:160, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:159 и SEQ ID NO:160, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:159 и SEQ ID NO:160, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:159 и SEQ ID NO:160, соответственно.

[0038] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в

SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162 и SEQ ID NO:163, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:165 и SEQ ID NO:166, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

[0039] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой биоаналогичное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на авелумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналог включает антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой авелумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело к PD-L1 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой авелумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой авелумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой авелумаб.

ТАБЛИЦА 22. Аминокислотные последовательности ингибиторов PD-L1, относящиеся к авелумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:157 тяжелая цепь авелумаба	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:158 легкая цепь авелумаба	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSEELQ ANKATLVCLI SDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SHRSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
SEQ ID NO:159 переменная область тяжелой цепи авелумаба	EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:160 переменная область легкой цепи авелумаба	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQQ HPGKAPKLM IYDVSNRPSGV 60 SNRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC SSYTSSSTRV FGTGTKVTVL 110
SEQ ID NO:161	SYIMM 5

CDR1 тяжелой цепи авелумаба	
SEQ ID NO:162 CDR2 тяжелой цепи авелумаба	SIYPSGGITF YADTVKG 17
SEQ ID NO:163 CDR3 тяжелой цепи авелумаба	IKLGTVTTVD Y 11
SEQ ID NO:164 CDR1 легкой цепи авелумаба	TGTSSDVGGY NYVS 14
SEQ ID NO:165 CDR2 легкой цепи авелумаба	DVSNRPS 7
SEQ ID NO:166 CDR3 легкой цепи авелумаба	SSYTSSSTRV 10

[0040] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб, также известный как MPDL3280A или RG7446 (коммерчески доступен как TECENTRIQ от Genentech, Inc., дочерней компании Roche Holding AG, Базель, Швейцария), или его антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты или варианты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, раскрытое в патенте США № 8217149, содержание которого специально включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой антитело, раскрытое в публикациях заявок на патент США №№ 2010/0203056 A1, 2013/0045200 A1, 2013/0045201 A1, 2013/0045202 A1 или 2014/0065135 A1, содержание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Получение и свойства атезолизумаба описаны в патенте США № 8217149, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности атезолизумаба представлены в таблице 52. Атезолизумаб имеет дисульфидные связи в тяжелой цепи (C23-C104) в положениях 22-96, 145-201, 262-322, 368-426, 22"-96", 145"-201", 262"-322" и 368"-426"; дисульфидные связи в легкой цепи (C23-C104) в положениях 23'-88', 134'-194', 23'''-88''' и 134'''-194'''; дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепью (h 5-CL 126) в положениях 221-214' и

221"-214""; дисульфидные связи между тяжелыми цепями (h 11, h 14) в положениях 227-227" и 230-230"; и сайты N-гликозилирования (H CH₂ N84,4>A) в положениях 298 и 298'.

[0041] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую цепь, представленную SEQ ID NO:167, и легкую цепь, представленную SEQ ID NO:168. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит тяжелую и легкую цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:167 и SEQ ID NO:168, соответственно.

[0042] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепи атезолизумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:169, а переменная область легкой цепи (V_L) ингибитора PD-L1 содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:170, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170, соответственно. В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170, соответственно. В одном из вариантов осуществления

ингибитор PD-L1 содержит области V_H и V_L , каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:169 и SEQ ID NO:170, соответственно.

[0043] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:172 и SEQ ID NO:173, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:175 и SEQ ID NO:176, соответственно, и их консервативные аминокислотные замены. В одном из вариантов осуществления антитело конкурирует за связывание и/или связывается с тем же эпитопом на PD-L1, что и любое из вышеупомянутых антител.

[0044] В одном из вариантов осуществления антитело к PD-L1 представляет собой биоаналогичное моноклональное антитело к PD-L1, одобренное регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на атезолизумаб. В одном из вариантов осуществления биоаналог включает антитело к PD-L1, содержащее аминокислотную последовательность, обладающую по меньшей мере 97% идентичностью, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью, аминокислотной последовательности референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, и содержащее одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с указанным референтным лекарственным препаратом или референтным биологическим препаратом, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления одна или более посттрансляционных модификаций выбраны из одной или более из следующих: гликозилирование, окисление, дезамидирование и усечение. В некоторых вариантах осуществления изобретения биоаналог представляет собой антитело к PD-L1, разрешенное или являющееся предметом заявки на разрешение, где указанное антитело к PD-L1 представлено в составе, который отличается от составов референтного лекарственного препарата или референтного биологического препарата, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой атезолизумаб. Антитело к PD-L1 может быть разрешено регулирующим органом по лекарственным средствам, таким как FDA в США и/или ЕМА в Европейском Союзе. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, причем одно или более вспомогательных веществ являются такими же или отличными от

вспомогательных веществ, содержащихся в референтном лекарственном препарате или референтном биологическом препарате, где указанный референтный лекарственный препарат или референтный биологический препарат представляет собой атезолизумаб.

ТАБЛИЦА 23. Аминокислотные последовательности ингибиторов PD-L1, относящиеся к атезолизумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO:167 тяжелая цепь атезолизумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYAST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSREEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
SEQ ID NO:168 легкая цепь атезолизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:169 переменная область тяжелой цепи атезолизумаба	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHWVRQA PGKGLEWVAW ISPYGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCARRH WPGGFDYWGQ GTLVTVSA 118
SEQ ID NO:170	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVS TAVAWYQQKP

вариабельная область легкой цепи атезолизумаба	GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YLYHPATFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:171 CDR1 тяжелой цепи атезолизумаба	GFTFSDSWIH 10
SEQ ID NO:172 CDR2 тяжелой цепи атезолизумаба	AWISPYGGST YYADSVKG 18
SEQ ID NO:173 CDR3 тяжелой цепи атезолизумаба	RHWPGGFDY 9
SEQ ID NO:174 CDR1 легкой цепи атезолизумаба	RASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:175 CDR2 легкой цепи атезолизумаба	SASFLYS 7
SEQ ID NO:176 CDR3 легкой цепи атезолизумаба	QQYLYHPAT 9

[0045] В одном из вариантов осуществления ингибиторы PD-L1 включают антитела, описанные в публикации заявки на патент США US 2014/0341917 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В еще одном варианте осуществления также включены антитела, которые конкурируют с любым из этих антител за связывание с PD-L1. В одном из вариантов осуществления антитело к PD-L1 представляет собой MDX-1105, также известное как BMS-935559, которое раскрыто в патенте США US 7943743, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления антитело к PD-L1 выбрано из антител к PD-L1, раскрытых в патенте США US 7943743, которые включены в настоящий документ посредством ссылки.

[0046] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой

коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как клон 10F.9G2 INVIVOMAB к m-PD-L1 (№ по каталогу BE0101, Bio X Cell, Inc., Вест Лебанон, Нью-Гэмпшир, США). В одном из вариантов осуществления антитело к PD-L1 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как AFFYMETRIX EBIOSCIENCE (MН1). Ряд коммерчески доступных антител к PD-L1 известен специалисту в данной области техники.

[0047] В одном из вариантов осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой коммерчески доступное моноклональное антитело, такое как BIOLEGEND 24F.10C12 мышиный IgG2a, изотип к (№ по каталогу 329602 Biologend, Inc., Сан-Диего, Калифорния), антитело SIGMA к PD-L2 (№ по каталогу SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., Сент-Луис, Миссури), или другие коммерчески доступные антитела к PD-L2, известные специалисту в данной области техники.

2. Необязательное лимфодеплетирующее предварительное кондиционирование пациентов

[00607] В одном из вариантов осуществления изобретение включает способ лечения рака с помощью популяции ТИЛ, в котором пациент предварительно получает немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией ТИЛ согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретение включает популяцию ТИЛ для применения в лечении рака у пациента, прошедшего предварительную немиелоаблативную химиотерапию. В одном из вариантов осуществления популяция ТИЛ предназначена для введения путем инфузии. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сут в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией ТИЛ) и флударабин 25 мг/м²/сут в течение 5 дней (дни с 27 по 23 перед инфузией ТИЛ). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ТИЛ (в день 0) согласно настоящему изобретению пациент получает внутривенную инфузию ИЛ-2 (альдеслейкин, коммерчески доступный как PROLEUKIN) в дозе 720 000 МЕ/кг раз в 8 часов до достижения физиологической толерантности. В отдельных вариантах осуществления популяция ТИЛ предназначена для применения в лечении рака в комбинации с ИЛ-2, где ИЛ-2 вводят после популяции ТИЛ.

[00608] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемую «иммуносупрессивным кондиционированием») перед введением ТИЛ согласно изобретению.

[00609] Как правило, лимфодеплеция достигается с помощью введения флударабина или циклофосфамида (активная форма которого называется мафосфамидом) и их комбинаций. Такие методы описаны в источниках Gassner, et al., Cancer Immunol.

Immunother. **2011**, 60, 75-85, Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., **2006**, 3, 668-681, Dudley, et al., J. Clin. Oncol. **2008**, 26, 5233-5239 и Dudley, et al., J. Clin. Oncol. **2005**, 23, 2346-2357, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00610] В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозировке 10 мг/кг/сут, 15 мг/кг/сут, 20 мг/кг/сут, 25 мг/кг/сут, 30 мг/кг/сут, 35 мг/кг/сут, 40 мг/кг/сут или 45 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение флударабином осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сут.

[00611] В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации 1 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозировке 100 мг/м²/сут, 150 мг/м²/сут, 175 мг/м²/сут, 200 мг/м²/сут, 225 мг/м²/сут, 250 мг/м²/сут, 275 мг/м²/сут или 300 мг/м²/сут. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (т. е. в/в). В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сут. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 4-5 дней в дозе 250 мг/м²/сут в/в. В некоторых вариантах осуществления лечение циклофосфамидом осуществляют в течение 4 дней в дозе 250 мг/м²/сут в/в.

[00612] В некоторых вариантах осуществления изобретения лимфодеплецию осуществляют путем одновременного введения пациенту флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 25 мг/м²/сут в/в, а циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м²/сут в/в в течение 4 дней.

[00613] В одном из вариантов осуществления лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

3. Режимы ПЛ-2

[00614] В одном из вариантов осуществления режим ПЛ-2 включает высокодозовый режим ПЛ-2, где указанный высокодозовый режим ПЛ-2 включает альдеслейкин или его биоаналог или вариант, вводимые внутривенно, начиная со следующего дня после

введения терапевтически эффективной части терапевтической популяции ТП, где альдеслейкин или его биоаналог или его вариант вводят в дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (массы тела пациента) с использованием 15-минутных болюсных внутривенных инфузий каждые восемь часов до достижения толерантности, всего максимум 14 доз. После 9 дней отдыха эта схема может быть повторена в течение еще 14 доз, всего максимум 28 доз. В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 вводят в 1, 2, 3, 4, 5 или 6 дозах. В некоторых вариантах осуществления ПЛ-2 вводят в максимальной дозировке вплоть до 6 доз.

[00615] В одном из вариантов осуществления режим ПЛ-2 включает режим с постепенным уменьшением дозы ПЛ-2. Режимы с постепенным уменьшением дозы ПЛ-2 описаны в источниках O'Day, et al., J. Clin. Oncol. **1999**, 17, 2752-61 и Eton, et al., Cancer **2000**, 88, 1703-9, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления режим с постепенным уменьшением дозы ПЛ-2 включает 18×10^6 МЕ/м², вводимые внутривенно в течение 6 часов с последующим введением 18×10^6 МЕ/м² внутривенно в течение 12 часов с последующим введением 18×10^6 МЕ/м² внутривенно в течение 24 часов с последующим введением $4,5 \times 10^6$ МЕ/м² внутривенно в течение 72 часов. Этот курс лечения может быть повторен раз в 28 дней, всего максимум четыре цикла. В одном из вариантов осуществления режим с постепенным уменьшением дозы ПЛ-2 включает 18 000 000 МЕ/м² в день 1, 9 000 000 МЕ/м² в день 2 и 4 500 000 МЕ/м² в дни 3 и 4.

[00616] В одном из вариантов осуществления режим ПЛ-2 включает введение пэгилированного ПЛ-2 раз в 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день в дозе от 0,10 мг/сут до 50 мг/сут.

ПРИМЕРЫ

[00617] Варианты осуществления настоящего изобретения далее описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры предоставлены только с целью иллюстрации, и объем настоящего изобретения никоим образом не следует толковать как ограниченное этими примерами, напротив, его необходимо толковать как охватывающее любые возможные вариации, очевидные в свете изложенных в настоящем документе принципов.

ПРИМЕР 1: ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕД ДЛЯ ПРОЦЕССОВ PRE-REP И REP

[00618] В данном примере описана процедура приготовления сред для культивирования тканей для использования в протоколах, связанных с культивированием опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИ), полученных из различных типов опухолей, включая немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ). Эти среды могут быть использованы для получения любых ТП, описанных в настоящей заявке и примерах.

Приготовление СМ1

[00619] Из холодильной камеры извлекали следующие реагенты и подогревали их на водяной бане при 37 °С: (RPMI1640, человеческая сыворотка группы АВ, 200 мМ L-глутамин). Готовили среду СМ1 в соответствии с приведенной ниже таблицей 18 путем добавления каждого из ингредиентов в верхнюю секцию фильтрующего устройства на 0,2

мкм, соответствующего фильтруемому объему. Хранили при 4 °С.

ТАБЛИЦА 24: Приготовление СМ1

Ингредиент	Конечная концентрация	Конечный объем 500 мл	Конечный объем ПЛ
RPMI1640	Н/Д	450 мл	900 мл
Человеческая сыворотка группы АВ, термоинактивированная, 10%	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ ВМЕ	55 мкМ	0,5 мл	1 мл
50 мг/мл гентамицина сульфата	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

[00620] В день использования предварительно подогрели необходимое количество СМ1 на водяной бане при 37°С и добавляли 6000 МЕ/мл ПЛ-2.

[00621] Дополнительные добавки - по мере необходимости в соответствии с таблицей 25.

ТАБЛИЦА 25: Дополнительные добавки в СМ1, по мере необходимости.

Добавка	Концентрация исходного раствора	Разведение	Конечная концентрация
GlutaMAX™	200 мМ	1:100	2 мМ
Пенициллин/стрептомицин	10 000 ЕД/мл пеницилина 10 000 мкг/мл стрептомицина	1:100	100 ЕД/мл пеницилина 100 мкг/мл стрептомицина
Амфотерицин В	250 мкг/мл	1:100	2,5 мкг/мл

Приготовление СМ2

[00622] Вынимали приготовленную СМ1 из холодильника или готовили свежую СМ1, как описано выше в разделе 7.3. Вынимали АИМ-V® из холодильника и готовили необходимое количество СМ2 путем смешивания приготовленной СМ1 с равным объемом АИМ-V® в стерильной бутылки для среды. Добавляли в среду СМ2 3000 МЕ/мл ПЛ-2 в день использования. Готовили достаточное количество СМ2 с 3000 МЕ/мл ПЛ-2 в день использования. Промаркировали бутылку со средой СМ2, указав ее название, инициалы приготовившего ее лица, дату ее фильтрации/приготовления, двухнедельный срок годности, и хранили при 4°С до тех пор, пока она не понадобилась для культивирования тканей.

Приготовление СМ3

[00623] Готовили СМЗ в тот день, когда ее было необходимо использовать. СМЗ была такой же, как среда AIM-V®, с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 в день использования. Готовили количество СМЗ, достаточное для экспериментальных нужд, путем добавления исходного раствора IL-2 непосредственно в бутылку или пакет с AIM-V. Хорошо перемешивали осторожным встряхиванием. Промаркировали бутылку «3000 МЕ/мл IL-2» сразу после добавления к AIM-V. Если образовывался избыток СМЗ, его хранили в бутылках при 4°C с указанием названия среды, инициалов приготовившего ее лица, даты приготовления среды и срока ее годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среды с добавкой IL-2 после 7 дней хранения при 4 °С.

Приготовление СМ4

[00624] СМ4 была такой же, как СМЗ, с дополнительной добавкой 2 мМ GlutaMAX™ (конечная концентрация). На каждый 1 л СМЗ добавляли 10 мл 200 мМ GlutaMAX™. Готовили количество СМ4, достаточное для экспериментальных нужд, путем добавления исходного раствора IL-2 и исходного раствора GlutaMAX™ непосредственно в бутылку или пакет с AIM-V. Хорошо перемешивали осторожным встряхиванием. Промаркировали бутылку «3000 МЕ/мл IL-2 и GlutaMAX» сразу после добавления к AIM-V. Если образовывался избыток СМ4, его хранили в бутылках при 4°C с указанием названия среды, «GlutaMAX», и срока ее годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среды с добавкой IL-2 после 7 дней хранения при 4 °С.

ПРИМЕР 2: ПРИМЕНЕНИЕ КОКТЕЙЛЯ ЦИТОКИНОВ IL-2, IL-15 И IL-21

[00625] В данном примере описано применение цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21, которые служат дополнительными факторами роста Т-клеток, в сочетании с процессом ТП из примеров с А по G.

[00626] Используя процессы, описанные в настоящем документе, ТП могут быть выращены из опухолей немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) в присутствии IL-2 в одной экспериментальной группе и комбинации IL-2, IL-15 и IL-21 вместо IL-2 в другой группе в начале культивирования. По завершении pre-REP культуры оценивали на экспансию, фенотип, функцию (CD107a⁺ и IFN-γ) и репертуар TCR Vβ. IL-15 и IL-21 описаны в других местах настоящего документа и в Gruijl, et al., IL-21 способствует экспансии CD27⁺CD28⁺ опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов с высоким цитотоксическим потенциалом и низкой параллельной экспансией регуляторных Т-клеток, Santegoets, S. J., J Transl Med., **2013**, 11:37 (размещено в Интернете по адресу: ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[00627] Результаты могут показать, что в условиях обработки IL-2, IL-15 и IL-21 может наблюдаться усиленная экспансия ТП (>20%) как в CD4⁺, так и в CD8⁺ клетках по сравнению с условиями в присутствии только IL-2. Наблюдался сдвиг в сторону преимущественно CD8⁺ популяции с неравномерным репертуаром TCR Vβ в ТП, полученных из культур, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, по сравнению с культурами, обработанными только IL-2. IFN-γ и CD107a были повышены в ТП, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, по сравнению с ТП, обработанными только IL-2.

ПРИМЕР 3: ОЦЕНКА ОТДЕЛЬНЫХ ПАРТИЙ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

[00628] В этом примере описывается новая сокращенная процедура для оценки отдельных партий гамма-облученных периферических моноклеарных клеток (МНПК, также известных как МНК) для использования в качестве аллогенных фидерных клеток в иллюстративных способах, описанных в настоящем документе.

[00629] Каждую партию облученных фидерных МНК получали от отдельного донора. Каждую партию или донора подвергали индивидуальному скринингу на предмет их способности осуществлять экспансию ТП в REP в присутствии очищенного антитела к CD3 (клон ОКТ3) и интерлейкина 2 (IL-2). Кроме того, каждую партию фидерных клеток тестировали без добавления ТП, чтобы убедиться, что полученная доза гамма-излучения была достаточной, чтобы сделать их неспособными к репликации.

Вводная информация

[00630] Для проведения REP ТП требовались гамма-облученные остановленные в росте фидерные клетки МНК. Мембранные рецепторы на фидерных МНК связываются с антителом к CD3 (клон ОКТ3) и перекрестно связываются с ТП в колбе для REP, стимулируя экспансию ТП. Партии фидеров готовили из лейкоферезного материала цельной крови, взятого у отдельных доноров. Продукт лейкофереза подвергали центрифугированию в Ficoll-Нураque, промывали, облучали и криоконсервировали в условиях GMP (надлежащей производственной практики).

[00631] Важно, чтобы пациентам, получившим терапию ТП, не вводили жизнеспособные фидерные клетки, поскольку это может привести к реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Таким образом, рост фидерных клеток останавливают путем обработки клеток гамма-облучением, что приводит к двухцепочечным разрывам ДНК и потере жизнеспособности клеток МНК при повторном культивировании.

Критерии оценки и условия эксперимента

[00632] Партии фидеров оценивали по двум критериям: 1) их способность осуществлять экспансию ТП при совместном культивировании в >100 раз и 2) их неспособность к репликации.

[00633] Партии фидеров тестировали в формате мини-REP с использованием двух линий первичных pre-REP ТП, выращенных в вертикальных колбах для культивирования тканей T25. Партии фидеров тестировали с двумя разными линиями ТП, поскольку каждая линия ТП уникальна по своей способности пролиферировать в ответ на активацию в REP. В качестве контроля вместе с тестируемыми партиями анализировали партию облученных фидерных клеток МНК, которые по имеющимся сведениям соответствуют вышеуказанным критериям.

[00634] Чтобы гарантировать, что все партии, протестированные в рамках одного эксперимента, прошли эквивалентное тестирование, было доступно достаточное исходное количество одних и тех же линий pre-REP ТП для тестирования всех условий и всех

партий фидеров.

[00635] Для каждой протестированной партии фидерных клеток было использовано в общей сложности шесть колб T25: линия Pre-REP TIL №1 (2 колбы); линия Pre-REP TIL №2 (2 колбы); и фидерный контроль (2 колбы). Колбы, содержащие линии TIL №1 и №2, позволяли оценить способность партии фидеров осуществлять экспансию TIL. Колбы с фидерным контролем позволяли оценить неспособность к репликации партии фидеров.

ПРОТОКОЛ ЭКСПЕРИМЕНТА

День -2/3, размораживание линий TIL

Приготовили среду CM2. Подогрели CM2 на водяной бане при 37 °C. Приготовили 40 мл CM2 с добавкой 3000 ME/мл IL-2. Поддерживали температуру до использования. Помещали 20 мл предварительно подогретой CM2 без IL-2 в каждую из двух конических пробирок на 50 мл, помеченных названиями используемых линий TIL. Доставали две обозначенные линии pre-REP TIL из хранилища с жидким N₂ и переносили флаконы в помещение для культивирования тканей. Размораживали флаконы, поместив их в герметичный пакет для хранения на молнии на водяную баню при 37°C до тех пор, пока не оставалось небольшое количество льда.

[00636] С помощью стерильной пипетки для переноса немедленно переносили содержимое флакона в 20 мл CM2 в подготовленной помеченной конической пробирке на 50 мл. Добавляли достаточное количество до 40 мл с использованием CM2 без IL-2 для промывки клеток. Центрифугировали при 400 x CF в течение 5 минут. Аспирировали супернатант и повторно суспендировали в 5 мл теплой CM2 с добавкой 3000 ME/мл IL-2.

[00637] Брали небольшую аликвоту (20 мкл) в двух экземплярах для подсчета клеток с использованием автоматического счетчика клеток. Записывали подсчеты. Во время подсчета помещали коническую пробирку на 50 мл с клетками TIL в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C, с ослабленной крышкой для обеспечения газообмена. Определяли концентрацию клеток и разводили TIL до 1×10^6 клеток/мл в CM2 с добавкой IL-2 в концентрации 3000 ME/мл.

[00638] Культивировали в 2 мл/лунку 24-луночного планшета для культивирования тканей в необходимом количестве лунок в увлажненном инкубаторе при 37 °C до дня 0 мини-REP. Культивировали различные линии TIL в отдельных 24-луночных планшетах для культивирования тканей, чтобы избежать путаницы и потенциального перекрестного загрязнения.

День 0, начало мини-REP

[00639] Готовили достаточно среды CM2 для тестируемого количества партий фидеров (например, для тестирования 4 партий фидеров за раз готовили 800 мл среды CM2). Отбирали аликвоту части CM2, полученной выше, и добавляли к ней 3000 ME/мл IL-2 для культивирования клеток (например, для тестирования 4 партий фидеров за раз готовили 500 мл среды CM2 с 3000 ME/мл IL-2).

[00640] Работая с каждой линией TIL по отдельности, чтобы предотвратить

перекрестное загрязнение, вынимали 24-луночный планшет с культурой ТП из инкубатора и переносили в BSC (бокс биологической безопасности).

[00641] С помощью стерильной пипетки для переноса или пипеточного дозатора на 100-1000 мкл и наконечника отбирали приблизительно 1 мл среды из каждой лунки с ТП для будущего использования, и помещали в неиспользуемую лунку 24-луночного планшета для культивирования тканей.

[00642] Используя свежую стерильную пипетку для переноса или пипеточный дозатор на 100-1000 мкл и наконечник, смешивали оставшуюся среду с ТП в лунках для повторного суспендирования клеток, а затем переносили клеточную суспензию в коническую пробирку на 50 мл, помеченную названием ТП, и записывали объем.

[00643] Промывали лунки запасной средой и переносили этот объем в ту же коническую пробирку на 50 мл. Центрифугировали клетки при 400 x CF, чтобы собрать клеточный осадок. Аспирировали супернатант среды и повторно суспендировали клеточный осадок в 2-5 мл среды CM2, содержащей 3000 ME/мл IL-2, объем, который следует использовать, зависел от количества собранных лунок и размера осадка - объем должен быть достаточным для обеспечения концентрации $>1,3 \times 10^6$ клеток/мл.

[00644] С помощью серологической пипетки тщательно перемешивали клеточную суспензию и записывали объем. Отбирали 200 мкл для подсчета клеток с помощью автоматического счетчика клеток. Во время подсчета помещали коническую пробирку на 50 мл с клетками ТП в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C, с ослабленной крышкой для обеспечения газообмена. Записывали подсчеты.

[00645] Вынимали коническую пробирку на 50 мл, содержащую ТП-клетки, из инкубатора и повторно суспендировали эти клетки при концентрации $1,3 \times 10^6$ клеток/мл в теплой CM2 с добавкой 3000 ME/мл IL-2. Возвращали коническую пробирку на 50 мл в инкубатор с ослабленной крышкой.

[00646] Повторяли описанные выше этапы для второй линии ТП.

[00647] Непосредственно перед высеванием ТП в колбы T25 для эксперимента ТП разводили 1:10 до конечной концентрации $1,3 \times 10^5$ клеток/мл, как указано ниже.

Приготовление рабочего раствора MACS GMP CD3 pure (ОКТ3)

[00648] Вынимали исходный раствор ОКТ3 (1 мг/мл) из холодильника с температурой 4°C и помещали в BSC. В среде для мини-REP использовали конечную концентрацию ОКТ3 30 нг/мл.

[00649] На 20 мл в каждой колбе T25, использованной в эксперименте, требовалось 600 нг ОКТ3; это было эквивалентно 60 мкл раствора 10 мкг/мл на каждые 20 мл или 360 мкл для всех 6 тестируемых колб для каждой партии фидеров.

[00650] Для каждой протестированной партии фидеров готовили 400 мкл разведенного 1:100 1 мг/мл ОКТ3 для рабочей концентрации 10 мкг/мл (например, для одновременного тестирования 4 партий фидеров необходимо приготовить 1600 мкл разведенного 1:100 1 мг/мл ОКТ3: 16 мкл 1 мг/мл ОКТ3+1,584 мл среды CM2 с 3000 ME/мл IL-2.)

Подготовка колб T25

[00651] Промаркировали каждую колбу и заполнили колбу средой CM2 перед подготовкой фидерных клеток. Помещали колбы в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C, чтобы среда оставалась теплой во время ожидания добавления оставшихся компонентов. После подготовки фидерных клеток компоненты будут добавлены в CM2 в каждой колбе.

ТАБЛИЦА 26: Растворы

Компонент	Объем в колбах для совместного культивирования	Объем в контрольных колбах (только с фидером)
CM2+3000 ME/мл IL-2	18 мл	19 мл
МНК: $1,3 \times 10^7$ /мл в CM2+3000 ME IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^7$ /колбу)	1 мл	1 мл
ОКТЗ: 10 мкг/мл в CM2+3000 ME IL-2	60 мкл	60 мкл
ТИЛ: $1,3 \times 10^5$ /мл в CM2 с 3000 ME IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^5$ /колбу)	1 мл	0

Подготовка фидерных клеток

[00652] Для этого протокола требовалось не менее 78×10^6 фидерных клеток на тестируемую партию. Каждый флакон на 1 мл, замороженный SDBB, содержал 100×10^6 жизнеспособных клеток после замораживания. Исходя из 50% выхода при размораживании из хранилища с жидким N₂, было рекомендовано размораживать по меньшей мере два флакона на 1 мл с фидерными клетками на партию, что дает примерно 100×10^6 жизнеспособных клеток для каждой REP. В качестве альтернативы, при поставке во флаконах объемом 1,8 мл достаточное количество фидерных клеток содержалось в одном флаконе.

[00653] Перед размораживанием фидерных клеток предварительно подогрели приблизительно 50 мл CM2 без IL-2 для каждой тестируемой партии фидеров. Обозначенные флаконы с партиями фидеров вынимали из хранилища с жидким N₂, помещали в пакет для хранения на молнии и помещали на лед. Размораживали флаконы внутри закрытого пакета для хранения на молнии путем погружения в водяную баню с температурой 37 °C. Вынимали флаконы из пакета на молнии, опрыскивали или протирали 70% этанолом и переносили флаконы в BSC.

[00654] С помощью пипетки для переноса немедленно переносили содержимое флаконов с фидерами в 30 мл теплой CM2 в конической пробирке на 50 мл. Промывали флакон небольшим объемом CM2 для удаления любых остаточных клеток во флаконе. Центрифугировали при 400 x CF в течение 5 минут. Аспирировали супернатант и повторно суспендировали в 4 мл теплой CM2 с 3000 ME/мл IL-2. Отбирали 200 мкл для

подсчета клеток с использованием автоматического счетчика клеток. Записывали подсчеты.

[00655] Повторно суспендировали клетки при $1,3 \times 10^7$ клеток/мл в теплой СМ2 с 3000 МЕ/мл ПЛ-2. Разводили ТПЛ-клетки с $1,3 \times 10^6$ клеток/мл до $1,3 \times 10^5$ клеток/мл.

Подготовка совместного культивирования

[00656] Разводили ТПЛ-клетки с $1,3 \times 10^6$ клеток/мл до $1,3 \times 10^5$ клеток/мл. В коническую пробирку на 15 мл добавляли 4,5 мл среды СМ2. ТПЛ-клетки вынимали из инкубатора и тщательно повторно суспендировали с помощью серологической пипетки на 10 мл. Из суспензии ТПЛ $1,3 \times 10^6$ клеток/мл отбирали 0,5 мл клеток и добавили к 4,5 мл среды в конической пробирке на 15 мл. Возвращали исходный флакон с ТПЛ в инкубатор. Хорошо перемешивали. Повторяли для второй линии ТПЛ.

Переносили колбы с предварительно подогретой средой для одной партии фидеров из инкубатора в BSC. Смешивали фидерные клетки путем перемешивания несколько раз наконечником пипетки на 1 мл и переносили по 1 мл ($1,3 \times 10^7$ клеток) в каждую колбу для этой партии фидеров. В каждую колбу добавляли 60 мкл рабочего раствора ОКТ3 (10 мкг/мл). Возвращали две контрольные колбы в инкубатор.

[00657] Переносили 1 мл ($1,3 \times 10^5$) каждой партии ТПЛ в колбу T25, помеченную соответствующим образом. Возвращали колбы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении. Оставляли до дня 5.

[00658] Повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

День 5, смена среды

Готовили СМ2 с 3000 МЕ/мл ПЛ-2. На каждую колбу требовалось 10 мл. Пипеткой на 10 мл перенесли 10 мл теплой СМ2 с 3000 МЕ/мл ПЛ-2 в каждую колбу. Возвращали колбы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 7. Повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

День 7, сбор

[00659] Вынимали колбы из инкубатора и переносили в BSC, стараясь не нарушить клеточный слой на дне колбы. Не затрагивая клетки, растущие на дне колб, отбирали по 10 мл среды из каждой тестируемой колбы и по 15 мл среды из каждой из контрольных колб.

[00660] Используя серологическую пипетку на 10 мл, повторно суспендировали клетки в оставшейся среде и хорошо перемешивали, чтобы разбить любые скопления клеток. После тщательного перемешивания клеточной суспензии с помощью пипетки отбирали 200 мкл для подсчета клеток. Подсчитывали ТПЛ, используя соответствующую стандартную рабочую процедуру в сочетании с оборудованием для автоматического подсчета клеток. Записывали подсчеты в день 7.

[00661] Повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

[00662] Контрольные колбы с фидерами оценивали на неспособность к репликации, а колбы, содержащие ТПЛ, оценивали на кратность экспансии с дня 0 в соответствии с приведенной ниже таблицей ТТ.

День 7, продолжение работы с контрольными колбами с фидерами до дня 14

[00663] После завершения подсчета в контрольных колбах с фидерами на день 7 в каждую из контрольных колб добавляли по 15 мл свежей среды CM2, содержащей 3000 ME/мл PL-2. Возвращали контрольные колбы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 14.

День 14, длительное отсутствие пролиферации в контрольных колбах с фидерами

[00664] Вынимали колбы из инкубатора и переносили в BSC, стараясь не нарушить клеточный слой на дне колбы. Не затрагивая клетки, растущие на дне колб, отбирали приблизительно по 17 мл среды из каждой из контрольных колб. Используя серологическую пипетку на 5 мл, повторно суспендировали клетки в оставшейся среде и хорошо перемешивали, чтобы разбить любые скопления клеток. Записывали объемы для каждой колбы.

[00665] После тщательного перемешивания клеточной суспензии с помощью пипетки отбирали 200 мкл для подсчета клеток. Подсчитывали TPL, используя соответствующую стандартную рабочую процедуру в сочетании с оборудованием для автоматического подсчета клеток. Записывали подсчеты.

[00666] Повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ**Результаты**

[00667] Доза гамма-облучения была достаточной, чтобы сделать фидерные клетки неспособными к репликации. Ожидалось, что все партии будут соответствовать критериям оценки, а также демонстрировать снижение общего жизнеспособного количества фидерных клеток, оставшихся на день 7 культивирования REP по сравнению с днем 0.

[00668] Ожидалось, что все партии фидеров будут соответствовать критерию оценки, состоящему в 100-кратном увеличении роста TPL к дню 7 культивирования REP.

[00669] Ожидалось, что подсчет в контрольных колбах с фидерами на день 14 продемонстрирует продолжение тенденции к отсутствию пролиферации, наблюдаемой в день 7.

Критерии приемлемости

[00670] Следующие критерии приемлемости были соблюдены для каждого параллельного образца линии TPL, протестированного для каждой партии фидерных клеток.

[00671] Приемлемость оценивали по двум параметрам, как показано ниже (указано в приведенной ниже таблице 27).

ТАБЛИЦА 27: Критерии приемлемости

Тест	Критерии приемлемости
Облучение МНК/неспособность к	Отсутствие роста на 7 и 14 дни

репликации	
Экспансия ТП	По меньшей мере 100-кратная экспансия каждой ТП (минимум $1,3 \times 10^7$ жизнеспособных клеток)

[00672] Оценивали, была ли доза облучения достаточной для того, чтобы сделать фидерные клетки МНК неспособными к репликации, при культивировании в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Неспособность к репликации оценивали по общему количеству жизнеспособных клеток (TVC), определенному с помощью автоматического подсчета клеток на день 7 и день 14 REP.

[00673] Критерием приемлемости было «отсутствие роста», что означает, что общее количество жизнеспособных клеток не увеличилось на день 7 и день 14 по сравнению с первоначальным количеством жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP.

[00674] Оценивали способность фидерных клеток поддерживать экспансию ТП. Рост ТП измеряли с точки зрения кратности экспансии жизнеспособных клеток от начала культивирования в день 0 REP до дня 7 REP. На день 7 культуры ТП достигли минимум 100-кратной экспансии (т. е. их количество более чем в 100 раз превышало общее количество жизнеспособных ТП-клеток, помещенных в культуру в день 0 REP), которую определяли с помощью автоматического подсчета клеток.

Проверка на неучтенные обстоятельства партий фидерных МНК, не соответствовавших критериям приемлемости

[00675] В случае, если партия фидерных МНК не соответствует ни одному из критериев приемлемости, описанных выше, будут предприняты следующие шаги для повторного тестирования этой партии, чтобы исключить из списка причин простую ошибку экспериментатора.

[00676] Если в партии оставалось два или более флаконов для вспомогательного тестирования, партию тестировали повторно. Если в партии оставался один или не оставалось флаконов для вспомогательного тестирования, то партию отклоняли в соответствии с критериями приемлемости, описанными выше.

[00677] Чтобы быть признанной годной, рассматриваемая партия и контрольная партия должны были соответствовать вышеуказанным критериям приемлемости. После удовлетворения этих критериев партию выпускали для использования.

ПРИМЕР 4: ОЦЕНКА ОТДЕЛЬНЫХ ПАРТИЙ ГАММА-ОБЛУЧЕННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ

[00678] В этом примере описывается новая сокращенная процедура для оценки отдельных партий гамма-облученных моноклеарных клеток периферической крови (МНПК) для использования в качестве аллогенных фидерных клеток в иллюстративных способах, описанных в настоящем документе. В этом примере представлен протокол для оценки партий облученных клеток МНПК для использования для производства клинических партий ТП. Каждую партию облученных МНПК получали от отдельного

донора. В ходе более чем 100 аттестационных протоколов было показано, что во всех случаях облученные партии МНПК из SDBB (банк крови Сан-Диего) вызывают более чем 100-кратную экспансию ТЛ на день 7 REP. Этот модифицированный аттестационный протокол был предназначен для применения к партиям облученных донорских МНПК из SDBB, которые затем были дополнительно протестированы для подтверждения того, что полученная доза гамма-излучения была достаточной, чтобы сделать их неспособными к репликации. После демонстрации того, что они сохраняли неспособность к репликации в течение 14 дней, партии донорских МНПК считались «годными» для использования для получения клинических партий ТЛ.

Вводная информация

[00679] Для проведения текущей стандартной REP ТЛ требовались гамма-облученные остановленные в росте МНПК. Мембранные рецепторы на МНПК связываются с антителом к CD3 (клон ОКТ3) и перекрестно связываются с ТЛ в культуре, стимулируя экспансию ТЛ. Партии МНПК готовили из лейкоферезного материала цельной крови, взятого у отдельных доноров. Продукт лейкофереза подвергали центрифугированию в Ficoll-Нураque, промывали, облучали и криоконсервировали в условиях GMP.

[00680] Важно, чтобы пациентам, получившим терапию ТЛ, не вводили жизнеспособные МНПК, поскольку это может привести к реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Таким образом, рост донорских МНПК останавливают путем обработки клеток гамма-облучением, что приводит к двухцепочечным разрывам ДНК и потере жизнеспособности МНПК при повторном культивировании.

Критерии оценки

[00681] 7.2.1 Критерием оценки партий облученных МНПК была их неспособность к репликации.

Условия эксперимента

[00682] Партии фидеров тестировали в формате мини-REP, как если бы они должны были быть культивированы совместно с ТЛ, с использованием вертикальных колб для культивирования тканей T25. Контрольная партия: одну партию облученных МНПК, которая по имеющимся сведениям соответствовала критерию 7.2.1, анализировали вместе с экспериментальными партиями в качестве контроля. Для каждой протестированной партии облученных донорских МНПК анализировали две параллельные колбы.

Протокол эксперимента

День 0

[00683] Готовили ~90 мл среды CM2 для каждой партии тестируемых донорских МНПК. Поддерживали CM2 теплой на водяной бане при 37 °C. Размораживали аликвоту 6×10^6 ME/мл IL-2. Возвращали среду CM2 в BSC, протерев 70% EtOH перед помещением в вытяжной шкаф. Из каждой протестированной партии МНПК отбирали приблизительно 60 мл CM2 в отдельную стерильную бутылку. К этой среде добавляли IL-2 из

размороженного исходного раствора 6×10^6 МЕ/мл до конечной концентрации 3000 МЕ/мл. Маркировали эту бутылку как «СМ2/IL2» (или аналогичным образом), чтобы отличить ее от СМ2 без добавок.

Подготовка ОКТ3

[00684] Вынимали исходный раствор антитела к CD3 (ОКТ3) из холодильника с температурой 4°C и помещали в BSC. В среде для мини-REP использовали конечную концентрацию ОКТ3 30 нг/мл. Готовили рабочий раствор 10 мкг/мл антитела к CD3 (ОКТ3) из исходного раствора 1 мг/мл. Помещали в холодильник до использования.

[00685] Для каждой протестированной партии МНПК готовили 150 мкл раствора антитела к CD3 (ОКТ3), разведенного 1:100. Например, для одновременного тестирования 4 партий МНПК готовили 600 мкл 10 мкг/мл антитела к CD3 (ОКТ3), добавляя 6 мкл 1 мг/мл исходного раствора к 594 мкл СМ2 с добавкой 3000 МЕ/мл IL-2.

Подготовка колб

[00686] Добавляли 19 мл СМ2/IL-2 на колбу в помеченные колбы T25 и помещали колбы в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37°C во время подготовки клеток.

Подготовка облученных МНПК

[00687] Вынимали флаконы с партиями МНПК для тестирования из хранилища с жидким N₂. Их хранили при -80°C или держали на сухом льду перед размораживанием. Помещали 30 мл СМ2 (без добавки IL-2) в конические пробирки на 50 мл для каждой партии, подлежащей размораживанию. Маркировали каждую пробирку разными номерами партий МНПК, подлежащих размораживанию. Плотнo закрывали пробирки крышками и помещали на водяную баню при 37°C перед использованием. При необходимости возвращали конические пробирки на 50 мл в BSC, протирая 70% EtOH перед помещением в вытяжной шкаф.

[00688] Вынимали флакон с МНПК из холодильной камеры и помещали в плавающий штатив для пробирок, находящийся в водяной бане при 37 °C, для размораживания. Оставляли размораживаться до тех пор, пока во флаконе не осталось небольшое количество льда. С помощью стерильной пипетки для переноса немедленно переносили содержимое флакона в 30 мл СМ2 в конической пробирке на 50 мл. Отбирали приблизительно 1 мл среды из пробирки для ополаскивания флакона; возвращали среду после ополаскивания в коническую пробирку на 50 мл. Плотнo закрывали крышками и осторожно вращали, чтобы промыть клетки.

[00689] Центрифугировали при 400 x g в течение 5 минут при комнатной температуре. Аспирировали супернатант и повторно суспендировали клеточный осадок в 1 мл теплой СМ2/IL-2 с помощью наконечника пипетки на 1000 мкл. В качестве альтернативы, перед добавлением среды повторно суспендировали клеточный осадок, перетаскивая закрытую крышкой пробирку вдоль пустого штатива для пробирок. После повторного суспендирования клеточного осадка доводили объем до 4 мл, используя среду СМ2/IL-2. Записывали объем.

[00690] Брали небольшую аликвоту (например, 100 мкл) для подсчета клеток с

использованием автоматического счетчика клеток. Дважды проводили подсчет в соответствии с СРП конкретного автоматического счетчика клеток. Как правило, перед подсчетом клеток необходимо было осуществить разведение МНПК. Рекомендуемое начальное разведение составляло 1:10, но оно варьировалось в зависимости от типа используемого счетчика клеток. Записывали подсчеты.

[00691] Доводили концентрацию МНПК до $1,3 \times 10^7$ клеток/мл с использованием среды CM2/IL-2. Хорошо перемешивали путем осторожного вращения или осторожного перемешивания аспирацией с помощью серологической пипетки.

Подготовка колб для культивирования

[00692] Возвращали две помеченные колбы T25 в BSC из инкубатора для культивирования тканей. Возвращали флакон с 10 мкг/мл антитела к CD3/ОКТ3 в BSC. В каждую колбу добавляли 1 мл суспензии $1,3 \times 10^7$ клеток МНПК. В каждую колбу добавляли 60 мкл 10 мкг/мл антитела к CD3/ОКТ3. Возвращали закрытые крышками колбы в инкубаторы для культивирования тканей для обеспечения роста в течение 14 дней без вмешательств. Помещали флакон с антителом к CD3/ОКТ3 обратно в холодильник до тех пор, пока он не понадобится для следующей партии. Повторяли для каждой партии подлежащих оценке МНПК.

День 14, измерение отсутствия пролиферации МНПК

[00693] Возвращали две параллельные колбы T25 в BSC. Для каждой колбы с помощью свежей серологической пипетки на 10 мл отбирали по ~17 мл из каждой колбы, затем осторожно вытягивали оставшуюся среду, чтобы измерить объем, оставшийся в колбах. Записывали объем.

[00694] Хорошо перемешивали образец с помощью этой же серологической пипетки.

[00695] Из каждой колбы отбирали образец объемом 200 мкл для подсчета. Подсчитывали клетки с помощью автоматического счетчика клеток. Повторяли этапы 7.4.26-7.4.31 для каждой партии оцениваемых МНПК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И КРИТЕРИЙ ПРИЕМЛЕМОСТИ

Результаты

[00696] Ожидалось, что доза гамма-облучения будет достаточной, чтобы сделать фидерные клетки неспособными к репликации. Ожидалось, что все партии будут соответствовать критерию оценки, демонстрируя снижение общего жизнеспособного количества фидерных клеток, оставшихся на день 14 культивирования REP по сравнению с днем 0.

Критерий приемлемости

[00697] Следующий критерий приемлемости был соблюден для каждой протестированной партии облученных донорских МНПК: «отсутствие роста», что означало, что общее количество жизнеспособных клеток на день 14 было меньше, чем первоначальное количество жизнеспособных клеток, помещенных в культуру в день 0 REP.

Проверка на неучтенные обстоятельства партий МНПК, не соответствовавших критерию приемлемости.

[00698] В случае, если партия облученных донорских МНПК не соответствовала критерию приемлемости, приведенному выше, предпринимали следующие шаги для повторного тестирования этой партии, чтобы исключить из списка причин неудовлетворительного результата простую ошибку экспериментатора. Если в партии оставалось два или более вспомогательных флакона, партию тестировали повторно. Если в партии оставался один или не оставалось вспомогательных флаконов, то партию отклоняли в соответствии с критерием приемлемости, приведенным выше.

[00699] Чтобы быть признанной годной, у партии МНПК, проходящей испытания на неучтенные обстоятельства, должны были быть признанными соответствующими критерию приемлемости как контрольная партия, так и обе параллельно тестируемые рассматриваемые партии. После удовлетворения этого критерия партию выпускали для использования.

ПРИМЕР 5: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО РАСТВОРА IL-2 (CELLGENIX)

[00700] В этом примере описывается процесс растворения очищенного лиофилизированного рекомбинантного человеческого интерлейкина 2 для получения исходных образцов, подходящих для использования в дальнейших протоколах культивирования тканей, включая все описанные в настоящей заявке и примерах, включая те, которые включают использование rhIL-2.

Процедура

[00701] Готовили 0,2% раствор уксусной кислоты (HAc). Вносили 29 мл стерильной воды в коническую пробирку на 50 мл. В коническую пробирку на 50 мл добавляли 1 мл 1 н. уксусной кислоты. Хорошо перемешивали, перевернув пробирку 2-3 раза. Стерилизовали раствор HAc фильтрацией с использованием фильтра Steriflip.

[00702] Готовили 1% HSA в PBS. Добавляли 4 мл 25% исходного раствора HSA к 96 мл PBS в стерильном фильтрующем устройстве на 150 мл. Фильтровали раствор. Хранили при 4 °C. Заполняли формы для каждого приготовленного флакона с rhIL-2.

[00703] Готовили исходный раствор rhIL-2 (конечная концентрация 6×10^6 МЕ/мл). Каждая партия rhIL-2 отличалась, и требовалась информация, содержащаяся в сертификате качества производителя (СК), например: 1) масса rhIL-2 на флакон (мг), 2) удельная активность rhIL-2 (МЕ/мг) и 3) рекомендуемый объем восстановления 0,2% HAc (мл).

[00704] Рассчитывали объем 1% HSA, необходимый для партии rhIL-2, используя приведенное ниже уравнение:

$$\left(\frac{\text{Масса флакона (мг)} \times \text{Биологическая активность} \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{МГ}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{МЛ}}} \right) - \text{объем HAc (мл)}$$

$$= \text{объем 1\% HSA (мл)}$$

[00705] Например, согласно СК партии 10200121 rhIL-2 от CellGenix удельная

активность для флакона на 1 мг составляет 25×10^6 МЕ/мг. Рекомендуется восстанавливать rhIL-2 в 2 мл 0,2% HAc.

$$\left(\frac{1 \text{ мг} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{МГ}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}}} \right) - 2 \text{ мл} = 2,167 \text{ мл HSA}$$

[00706] Протерли резиновую пробку флакона с IL-2 спиртовой салфеткой. С помощью иглы 16G, присоединенной к шприцу объемом 3 мл, вводили рекомендуемый объем 0,2% HAc во флакон. Следили за тем, чтобы не сдвинуть пробку при извлечении иглы. Переворачивали флакон 3 раза и вращали, пока весь порошок не растворился. Осторожно снимали пробку и оставляли на спиртовой салфетке. Добавляли во флакон рассчитанный объем 1% HSA.

[00707] Хранение раствора rhIL-2. Для кратковременного хранения (<72 часов) хранили во флаконе при 4 °C. Для длительного хранения (>72 часов) флакон делили на аликвоты меньшего объема и хранили в криопробирках при -20°C до готовности к использованию. Избегали циклов замораживания/размораживания. Срок годности истекал через 6 месяцев после даты приготовления. Этикетки rh-IL-2 включали название производителя и номер по каталогу, номер партии, срок годности, инициалы лаборанта, концентрацию и объем аликвоты.

ПРИМЕР 6: ПРОЦЕСС КРИОСЕРВАЦИИ

[00708] В этом примере описан метод процесса криоконсервации для TIL, приготовленных с помощью сокращенной процедуры в закрытой среде, описанной в примере G, с использованием морозильной камеры с контролируемой скоростью охлаждения CryoMed, модель 7454 (Thermo Scientific).

[00709] Использовали следующее оборудование: алюминиевый держатель для кассет (совместимый с пакетами для заморозки CS750), кассеты для криоконсервации для пакетов объемом 750 мл, резервуар с жидким азотом низкого давления (22 фунта на кв. дюйм), холодильник, термопарный датчик (ленточный для пакетов) и пакеты для заморозки CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[00710] Процесс замораживания обеспечивает скорость 0,5°C от зародышеобразования до -20°C и скорость охлаждения 1°C в минуту до конечной температуры -80 °C. Параметры программы следующие: Шаг 1 - выждать при 4 °C; Шаг 2: 1,0 °C/мин (температура образца) до -4 °C; Шаг 3: 20,0 °C/мин (температура камеры) до -45 °C; Шаг 4: 10,0 °C/мин (температура камеры) до -10,0 °C; Шаг 5: 0,5 °C/мин (температура камеры) до -20 °C; и Шаг 6: 1,0 °C/мин (температура образца) до -80 °C.

ПРИМЕР 7: ЛЕЧЕНИЕ НМРЛ АНТИТЕЛАМИ К PD-1

Популяция пациентов:

[00711] Пациенты с НМРЛ, не получавшие лечение или прошедшие химиотерапию, но не получавшие лечение антителом к PD-1/PD-L1

График лечения:

[00712] Фрагмент опухоли, лечение до 4 доз антитела к PD-1/PD-L1, лечение

пациентов, рефрактерных к первичной терапии, продуктом ТП, криоконсервированным и готовым к использованию при внезапном прогрессировании. Пациенты, рефрактерные к первичной терапии, могут прогрессировать после 2 доз.

[00713] Пациентов с рецидивом также можно лечить после прогрессирования (время развития может варьироваться от месяцев до лет).

[00714] Максимальный П-2 вплоть до 6 доз.

[00715] Другие рассматриваемые популяции пациентов с теми же производственными комбинациями, отмеченными ранее:

Пациенты с НМРЛ, не получавшие лечение или прошедшие химиотерапию, но не получавшие лечение антителом к PD-1/PD-L1.

Пациенты с НМРЛ, не получавшие лечение или прошедшие химиотерапию, но не получавшие лечение антителом к PD-1/PD-L1, имеющие низкую экспрессию PD-L1.

Пациенты с НМРЛ, не получавшие лечение или прошедшие химиотерапию, но не получавшие лечение антителом к PD-1/PD-L1, имеющие низкую экспрессию PD-L1 и/или имеющие массивное поражение на исходном уровне (например, массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо массивными считаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более на КТ; см., например, источник Samejima, J., Japanese Journal of Clinical Oncology, 45(11): 1050-10541 2015, включенный в настоящий документ посредством ссылки).

ПРИМЕР 8: МНОГОЦЕНТРОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ФАЗЫ 2 АУТОЛОГИЧНЫХ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С СОЛИДНЫМИ ОПУХОЛЯМИ

ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Обзор

[00716] В этом примере описано проспективное открытое, многокогортное, нерандомизированное, многоцентровое исследование фазы 2, в котором оценивали АСТ с использованием ТП в комбинации с пембролизумабом или ТП в качестве монотерапии, с использованием ТП, полученных, как описано в настоящей заявке, а также в этом примере.

Цели:

Основные:

[00717] Оценить эффективность аутологичных ТП в комбинации с пембролизумабом у пациентов с ММ, ПКРГШ или НМРЛ, или ТП в качестве монотерапии у пациентов с рецидивирующим или рефрактерным (p/p) НМРЛ, ранее прогрессировавших во время или после лечения СР1 (ингибиторами контрольных точек), как определено по частоте объективного ответа (ЧОО) с использованием критериев оценки ответа солидных опухолей (RECIST 1.1) согласно оценке исследователя.

[00718] Охарактеризовать профиль безопасности ТП в комбинации с пембролизумабом у пациентов с ММ, ПКРГШ и НМРЛ, или ТП в качестве монотерапии у

пациентов с р/р НМРЛ, измеренный по частоте возникновения нежелательных явлений степени ≥ 3 , возникших в ходе лечения (НЯВЛ).

Второстепенные:

[00719] Дополнительно оценить эффективность аутологичных ТЛ в комбинации с пембролизумабом у пациентов с ММ, ПКРГШ и НМРЛ, или ТЛ в качестве монотерапии у пациентов с р/р НМРЛ, используя частоту полного ответа (ПО), длительность ответа (ДО), частоту контроля заболевания (ЧКЗ), выживаемость без прогрессирования (ВБП) с использованием RECIST 1.1, согласно оценке исследователя, и общей выживаемости (ОВ).

Когорты:

[00720] Когорта 1А: терапия ТЛ в комбинации с пембролизумабом у пациентов с неоперабельной стадией ШС или IV или ММ с ≤ 3 предшествующими линиями системной терапии, за исключением иммунотерапии. Если пациенты ранее получали лечение, у них должно было быть рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

[00721] Когорта 2А: терапия ТЛ в комбинации с пембролизумабом у пациентов с распространенным, рецидивирующим или метастатическим НМРЛ (например, стадии T1N1-N2b, T2-4N0-N2b) с ≤ 3 предшествующими линиями системной терапии, за исключением иммунотерапии. Если пациенты ранее получали лечение, у них должно было быть рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

[00722] Когорта 3А: терапия ТЛ в комбинации с пембролизумабом у пациентов с местнораспространенным или метастатическим (стадия III- IV) НМРЛ с ≤ 3 предшествующими линиями системной терапии, за исключением иммунотерапии. Если пациенты ранее получали лечение, у них должно было быть рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

[00723] Когорта 3В: терапия ТЛ в качестве единственного агента у пациентов с НМРЛ стадии III или стадии IV, ранее получавших системную терапию СР1 (например, анти-PD-1/анти-PD-L1) в рамках ≤ 3 предшествующих линий системной терапии. Если пациенты ранее получали лечение, у них должно было быть рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

[00724] Пациенты в когортах 3А и 3В (НМРЛ) с онкоген-зависимыми опухолями при доступной эффективной таргетной терапии должны были получить по крайней мере одну линию таргетной терапии.

[00725] Все пациенты получали терапию аутологичными криоконсервированными ТЛ (с пембролизумабом или без него, в зависимости от присвоенной когорты), которой предшествовал режим предварительного кондиционирования посредством немиелоаблативной лимфодеплеции (NMA-LD), состоящий из циклофосфида и флударабина. После инфузии ТЛ вводили максимум до 6 в/в доз интерлейкина 2 (IL-2).

[00726] Следующие общие периоды исследования проводились во всех 4 когортах,

если не указано иное.

[00727] Скрининг и резекция опухоли: до 4 недель (28 дней) с момента включения в исследование; производство продукта ТП: примерно ≤ 22 дней после резекции опухоли; и период лечения, как обсуждается ниже.

[00728] Период лечения (когорты 1А, 2А и 3А): до 2 лет, включая NMA-LD (7 дней), инфузию ТП (1 день) с последующими введениями П-2 (от 1 до 4 дней). Пациенты получают однократную инфузию пембролизумаба после завершения резецирования их опухоли для получения ТП и сканирования на исходном уровне, но до начала режима NMA-LD. Следующая доза пембролизумаба будет введена не ранее, чем после завершения курса П-2, и продолжена 1 р/3 нед \pm 3 дня после этого в течение ≤ 2 лет (24 месяцев) или до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности, в зависимости от того, что произойдет раньше. Посещение по завершении лечения (ЕОТ) происходило в течение 30 дней после введения последней дозы пембролизумаба. Посещение могло быть совмещено с посещением для итоговой оценки (ЕОА), если это применимо (например, произошло прекращение приема пембролизумаба при прогрессировании заболевания или при начале новой противоопухолевой терапии).

[00729] Период лечения (когорты 3В): до 12 дней, включая NMA-LD (7 дней), ТП, инфузию (1 день) с последующими введениями П-2 (от 1 до 4 дней). Посещение ЕОТ происходило после того, как пациент получил последнюю дозу П-2. Посещение ЕОТ проводилось в течение 30 дней после прекращения лечения и могло быть совмещено с любым запланированным посещением в течение этого интервала во время периода оценки.

[00730] Период оценки: начинался после инфузии ТП в день 0 и заканчивался при прогрессировании заболевания, с началом новой противоопухолевой терапии, частичным отзывом согласия на предусмотренные исследованием оценки или через 5 лет (месяц 60), в зависимости от того, что наступит раньше. Посещение для итоговой оценки (ЕОА) происходило, как только пациент достиг прогрессирования заболевания или начал новую противоопухолевую терапию.

[00731] Терапия аутологичными ТП с использованием ТП, полученных, как описано в настоящем документе, состояла из следующих этапов:

1. Резекция опухоли для получения аутологичной ткани, которая служит источником клеточного продукта ТП;
2. Продукт ТП, произведенный на центральном предприятии в условиях надлежащей производственной практики (GMP);
3. 7-дневный режим предварительного кондиционирования NMA-LD;
4. Когорты 1А, 2А и 3А: пациенты получают однократную инфузию пембролизумаба после завершения резецирования их опухоли для получения ТП и сканирования на исходном уровне, но до начала режима NMA-LD. Следующая доза пембролизумаба будет введена не ранее, чем после завершения курса П-2, и продолжена 1 р/3 нед \pm 3 дня после этого.

5. Инфузия продукта аутологичных ТП (день 0); и

6. В/в введения П-2 максимум до 6 доз.

[00732] В когортах 1А, 2А и 3А следующую дозу пембролизумаба вводили не ранее, чем после завершения курса П-2, и продолжали 1 р/3 нед \pm 3 дня после этого в течение \leq 2 лет (24 месяцев) или до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности, в зависимости от того, что происходило раньше.

[00733] Блок-схемы для когорт 1А, 2А и 3А приведены на фиг. 7. Блок-схема для когорты 3В приведена на фиг. 8. Пациенты были отнесены к соответствующей когорте по признакам опухоли.

Терапия ТП+пембролизумабом (когорты 1А, 2А и 3А)

[00734] Пациенты проходили скрининг, и им назначали операцию по резекции опухоли. Затем у пациентов осуществляли резекцию одного или более опухолевых очагов, которые отправляли на центральное производственное предприятие для производства ТП.

[00735] Затем начинали режим NMA-LD, который состоял из 2 дней в/в циклофосфида (60 мг/кг) с месной (в соответствии со стандартом медицинской помощи или USPI/SmPC (инструкция по медицинскому применению препарата, зарегистрированного в США)) в день -7 и день -6 с последующими 5 днями в/в флударабина (25 мг/м²: с дня -5 по день -1).

[00736] Пациенты в когортах 1А, 2А и 3А получили однократную инфузию пембролизумаба после завершения резекции их опухоли для получения ТП и сканирования на исходном уровне, до начала режима NMA-LD. Введения П-2 в дозе 600 000 МЕ/кг в/в начинали уже через 3 часа после, но не позднее, чем через 24 часа, после завершения инфузии ТП в день 0. Дополнительные введения П-2 будут проводиться примерно раз в 8-12 часов, максимум до 6 доз. Вторая доза пембролизумаба была введена не ранее, чем после завершения курса П-2. Пациенты должны были восстановиться от всех токсических эффектов, связанных с П-2 (степени \leq 2), до второго введения пембролизумаба. Пембролизумаб будет продолжен 1 р/3 нед \pm 3 дня после этого в течение \leq 2 лет (24 месяцев) или до прогрессирования заболевания или неприемлемой токсичности, в зависимости от того, что произойдет раньше.

Терапия ТП в качестве единственного агента (когорты 3В)

[00737] Пациенты проходили скрининг, и им назначали операцию по резекции опухоли. Затем у пациентов осуществляли резекцию одного или более опухолевых очагов, которые отправляли на центральное производственное предприятие для производства ТП.

[00738] Затем проводили режим NMA-LD, который состоял из 2 дней в/в циклофосфида (60 мг/кг) с месной (в соответствии со стандартом медицинской помощи или USPI/SmPC) в день -7 и день -6 с последующими 5 днями в/в флударабина (25 мг/м²: с дня -5 по день -1).

Инфузию продукта аутологичных ТП, полученных из опухоли, проводили не ранее, чем через 24 часа после последней дозы флударабина. Введения П-2 в дозе 600 000 МЕ/кг в/в могли быть начаты уже через 3 часа после, но не позднее, чем через 24 часа,

после завершения инфузии ТП.

[00739] Дополнительные введения ИЛ-2 проводили примерно раз в 8-12 часов, максимум до 6 доз.

Получение и экспансия опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

[00740] Аутологичный клеточный продукт ТП состоял из жизнеспособных цитотоксических Т-лимфоцитов, полученных из опухоли/очага поражения пациента, произведенных *ex vivo* на центральном предприятии в условиях GMP. Иллюстративная блок-схема, изображающая процесс производства ТП, приведена, например, на фиг. 9.

[00741] Процесс производства ТП начинался в клиническом центре после хирургического удаления первичного или вторичного метастатического опухолевого очага (очагов) диаметром $\geq 1,5$ см у каждого отдельного пациента. Может быть удалено множество опухолевых очагов из различных анатомических локализаций для получения общей совокупности опухолевой ткани; однако эта совокупность не должна превышать 4,0 см в диаметре или 10 г в массе из-за ограниченного количества среды для биоконсервации, присутствующей в бутылки для транспортировки.

[00742] После помещения опухолевого очага (очагов) в бутылку для транспортировки с биоконсервацией его отправляли при температуре от 2°C до 8°C с помощью экспресс-доставки на центральное производственное предприятие в условиях GMP. По прибытии образец (образцы) опухоли подвергали диссекции на фрагменты, которые затем культивировали в соответствии с протоколом предварительной быстрой экспансии (Pre-REP) с человеческим рекомбинантным ИЛ-2 в течение ~11 дней.

[00743] Эти pre-REP-клетки затем были дополнительно подвергнуты экспансии с использованием протокола быстрой экспансии (REP) в течение 11 дней в присутствии ИЛ-2, ОКТ3 (мышинное моноклональное антитело к человеческому CD3, также известное как [муромонаб-CD3]) и облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (МНПК) в качестве фидерных клеток.

[00744] Затем подвергнутые экспансии клетки собирали, промывали, объединяли со вспомогательными веществами, криоконсервировали и отправляли в клинический центр экспресс-доставкой. Дозированная форма клеточного продукта ТП представляла собой замороженную аутологичную «суспензию живых клеток», которая была готова для инфузии пациенту, от которого были получены ТП. Пациенты должны были получить полную дозу продукта, который был произведен и выпущен, который содержал от 1×10^9 до 150×10^9 жизнеспособных клеток, в соответствии со спецификацией продукта. Клинический опыт показал, что в этом диапазоне доз достигались объективные ответы опухоли, и он также оказался безопасным (Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. **2012**;18(24):6758-70). Полную дозу продукта помещали в четыре пакета для инфузии.

Подготовка пациентов к получению клеточного продукта ТП

[00745] Режим предварительного кондиционирования NMA-LD, использованный в этом исследовании (т. е. 2 дня циклофосфида плюс месна, а затем 5 дней флударабина), был основан на методе, разработанном и протестированном Национальным институтом

онкологии (Rosenberg S.A., et al., Clin Cancer Res. **2011**;17(13):4550-7; Radvanyi L.G., et al., Clin Cancer Res. **2012**;18(24):6758-70; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. **2008**;26(32):5233-9; Pilon-Thomas S, et al., J Immunother. **2012**;35(8):615-20; Dudley M.E., et al., J Clin Oncol. **2005**;23(10):2346-57; и Dudley M.E., et al., Science. **2002**;298(5594):850-4). После 7-дневного режима предварительного кондиционирования пациенту проводили инфузию клеточного продукта ТП.

[00746] После инфузии ТП осуществляли в/в введение ИЛ-2 (600 000 МЕ/кг) раз в 8-12 часов, при этом первую дозу вводили через 3-24 часа после завершения инфузии ТП и продолжали максимум до 6 доз. Согласно стандартам лечебного учреждения дозы ИЛ-2 могут быть рассчитаны на основе фактической массы тела.

ОТБОР ПОПУЛЯЦИЙ ПАЦИЕНТОВ

Когорта 1А:

[00747] Пациенты имели подтвержденный диагноз неоперабельной ММ (стадия ШС или стадия IV, гистологически подтвержденная согласно системе стадирования Американского объединенного онкологического комитета [AJCC]). Пациенты с меланомой глаза были исключены. Пациенты не должны были ранее получать иммуноонкологические таргетные препараты. Если рак был положительным по мутации BRAF, пациент мог ранее получать терапию, нацеленную на BRAF/МЕК.

Когорта 2А:

[00748] Пациенты имели распространенный, рецидивирующий и/или метастатический НМРЛ и могли не получать лечение; требовался гистологический диагноз первичной опухоли посредством гистопатологического заключения. Пациенты не должны были ранее получать режимы иммунотерапии.

Когорта 3А:

[00749] Пациенты имели подтвержденный диагноз НМРЛ стадии Ш или IV (плоскоклеточного, аденокарциномы, крупноклеточной карциномы). Пациенты с онкоген-зависимыми опухолями при доступной эффективной таргетной терапии получили по меньшей мере одну линию таргетной терапии.

Когорта 3В:

[00750] Пациенты имели подтвержденный диагноз НМРЛ стадии Ш или IV (плоскоклеточного, аденокарциномы, крупноклеточной карциномы) и ранее получали системную терапию СР1 (например, анти-PD-1/анти-PD-L1). Пациенты с онкоген-зависимыми опухолями при доступной эффективной таргетной терапии получили по меньшей мере одну линию таргетной терапии.

[00751] Все пациенты получили до 3 предшествующих системных противоопухолевых терапий (см. критерии включения ниже), за исключением иммунотерапии для когорт 1А, 2А и 3А. Если пациенты ранее получали лечение, у них имело место рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

Критерии включения

[00752] Пациенты должны соответствовать ВСЕМ из следующих критериев включения для участия в исследовании:

1. У всех пациентов имелся гистологически или патоморфологически подтвержденный диагноз злокачественного новообразования их соответствующих гистологий:

Неоперабельная или метастатическая меланома (когорта 1А)

Распространенная, рецидивирующая или метастатическая плоскоклеточная карцинома головы и шеи (когорта 2А)

НМРЛ стадии III или стадии IV (плоскоклеточный, неплоскоклеточный, аденокарцинома, крупноклеточная карцинома) (когорты 3А и 3В).

2. Только когорты 1А, 2А и 3А: пациенты не получали иммунотерапию. Если пациенты ранее получали лечение, они прогрессировали во время или после последней терапии. Когорты 1А, 2А и 3А могли получить до 3 предшествующих системных противоопухолевых терапий, а именно:

В когорте 1А: пациенты с неоперабельной или метастатической меланомой (стадия IIIС или стадия IV); если положительна по мутации BRAF, пациенты могли получать ингибитор BRAF.

В когорте 2А: пациенты с неоперабельным или метастатическим ПКРГШ. Пациенты, получившие начальную химиолучевую терапию, были допущены к участию.

В когорте 3А: пациенты с НМРЛ стадии III или стадии IV (плоскоклеточным, неплоскоклеточным, аденокарциномой или крупноклеточной карциномой), которые ранее не получали иммунотерапию и прогрессировали после ≤ 3 линий предшествующей системной терапии при местнораспространенном или метастатическом заболевании. Пациенты, получавшие системную терапию в качестве адъювантной или неоадъювантной терапии, или как часть радикальной химиолучевой терапии, соответствовали критериям включения и считались получившими одну линию терапии, если заболевание прогрессировало в течение 12 месяцев после завершения предшествующей системной терапии. Пациенты с известными онкогенными факторами (например, EGFR, ALK, ROS), имевшие мутации, чувствительные к таргетным видам терапии, должны были прогрессировать после по меньшей мере 1 линии таргетной терапии.

3. Только когорта 3В: пациенты с НМРЛ стадии III или стадии IV (плоскоклеточным, неплоскоклеточным, аденокарциномой или крупноклеточной карциномой), ранее получавшие системную терапию CPI (например, анти-PD-1/анти-PD-L1) в рамках ≤ 3 предшествующих линий системной терапии.

У пациентов имело место рентгенологически подтвержденное прогрессирование во время или после последней терапии.

Пациенты, получавшие системную терапию в качестве адъювантной или неоадъювантной терапии, или как часть радикальной химиолучевой терапии, соответствовали критериям включения и считались получившими 1 линию терапии, если заболевание прогрессировало в течение 12 месяцев после завершения предшествующей

системной терапии.

Пациенты с известными онкогенными факторами (например, EGFR, ALK, ROS), имевшие мутации, чувствительные к таргетным видам терапии, должны были прогрессировать после по меньшей мере 1 линии таргетной терапии.

4. Пациенты имели по меньшей мере 1 резектабельный очаг поражения (или совокупные очаги поражения) диаметром не менее 1,5 см после резекции для получения исследуемого продукта TIL. Было рекомендовано получать опухолевую ткань из множественных и разнообразных метастатических очагов, если хирургическая резекция не представляла дополнительных рисков для пациента.

Если очаг поражения, рассматриваемый для резекции для получения TIL, находится в пределах ранее облученного поля, этот очаг поражения должен демонстрировать рентгенографически подтвержденное прогрессирование до резекции.

Пациенты должны иметь приемлемый гистопатологический образец для тестирования согласно протоколу.

5. У пациентов оставалось измеримое заболевание в соответствии со стандартными и хорошо известными рекомендациями RECIST 1.1 (см., например, Eisenhauer, European Journal of Cancer 45:228-247 (2009), также доступный в интернете по адресу project.eortc.org/recist/wp-content/uploads/sites/4/2015/03/RECISTGuidelines.pdf) после резекции опухоли для производства TIL:

Очаги поражения в ранее облученных областях не выбирали в качестве целевых очагов поражения, если не было продемонстрировано прогрессирование заболевания в этих очагах поражения;

Поражения, которые были частично резецированы для получения TIL, которые все были измеримыми согласно RECIST, могут быть выбраны в качестве нецелевых очагов поражения, но не могут служить целевым очагом поражения для оценки ответа.

6. На момент получения согласия пациентам было ≥ 18 лет.

7. Пациенты имели оценку общего состояния по шкале Восточной объединенной группы онкологов (ECOG) 0 или 1 и предполагаемую продолжительность жизни ≥ 3 месяцев.

8. Пациенты с репродуктивным потенциалом или имевшие партнеров с репродуктивным потенциалом должны были быть готовы придерживаться одобренного метода высокоэффективной контрацепции во время лечения и продолжать придерживаться его в течение 12 месяцев после получения всей терапии, предусмотренной протоколом (примечание: женщины с репродуктивным потенциалом должны были использовать эффективные виды контрацепции во время лечения и в течение 12 месяцев после последней дозы IL-2 или 4 месяцев после последней дозы пембролизумаба, в зависимости от того, что происходило позже). Мужчины не могли сдавать сперму во время исследования или в течение 12 месяцев после прекращения лечения, в зависимости от того, что происходило позже.

9. Пациенты имели следующие гематологические параметры:

Абсолютное количество нейтрофилов (АКН) $\geq 1000/\text{мм}^3$;

Гемоглобин $\geq 9,0$ г/дл;

Количество тромбоцитов $\geq 100\ 000/\text{мм}^3$.

10. У пациентов была приемлемая функция органов:

Сывороточная аланинаминотрансфераза (АЛТ)/сывороточная глутамино-пировиноградная трансаминаза (SGPT) и аспартатаминотрансфераза (АСТ)/SGOT ≤ 3 раз выше верхней границы нормы (ULN), пациенты с метастазами в печени ≤ 5 раз выше ULN.

Расчетный клиренс креатинина ≥ 40 мл/мин по формуле Кокрофта-Голта при скрининге.

Общий билирубин ≤ 2 мг/дл.

Пациенты с синдромом Жильбера должны иметь общий билирубин ≤ 3 мг/дл.

11. Пациенты были серонегативными к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ1 и ВИЧ2). Пациенты с положительной серологией на поверхностный антиген вируса гепатита В (HBsAg), антителами к ядерному антигену вируса гепатита В (анти-НВс) или вирусу гепатита С (анти-НСV), свидетельствующие об острой или хронической инфекции, были включены в исследование в зависимости от вирусной нагрузки, определенной на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), и местной распространенности определенных вирусных воздействий.

12. Пациенты прошли период отмывки от предшествующей противоопухолевой терапии(ий) минимальной продолжительности, как подробно описано ниже, до первого исследуемого лечения (т. е. до начала NMA-LD или пембролизумаба):

Таргетная терапия: предшествующая таргетная терапия агентами, нацеленными на рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), MEK, BRAF, ALK, ROS1 или другие мишени (например, эрлотиниб, афатиниб, дакомитиниб, осимертиниб, кризотиниб, церитиниб, лорлатиниб), была разрешена при условии, что период отмывки составлял по меньшей мере 14 дней до начала лечения.

Химиотерапия: была разрешена адьювантная, неоадьювантная или радикальная химиотерапия/химиолучевая терапия при условии, что период отмывки составлял по меньшей мере 21 день до начала лечения.

Иммунотерапия только для когорты 3В, предшествующая нацеленная на контрольные точки терапия антителом к PD-1, другими моноклональными антителами или вакцинами была разрешена с периодом отмывки ≥ 21 дня до начала NMA-LD.

Паллиативная лучевая терапия: дистанционная лучевая терапия была разрешена при условии, что все связанные с облучением токсические эффекты разрешились до степени 1 или исходного уровня, за исключением алопеции, изменения пигментации кожи или других клинически незначимых явлений, например, лучевого дерматита на небольших участках, императивных позывов на дефекацию или мочеиспускание

Опухолевый очаг (очаги), оцениваемый как мишень для ответа с помощью RECIST 1.1, находился за пределами радиационного портала; однако, если он находился внутри портала, он должен был демонстрировать прогрессирование (см. раздел Критерий

включения выше).

Хирургическое вмешательство/запланированная процедура: предыдущая(ие) хирургическая процедура была разрешена при условии, что рана зажила, все осложнения разрешились и прошло не менее 14 дней (для основных операционных процедур) перед резекцией опухоли.

13. Пациенты выздоровели от всех предшествующих нежелательных явлений, связанных с противоопухолевым лечением (TRAE), до степени ≤ 1 (согласно Общим терминологическим критериям нежелательных явлений [CTCAE]), за исключением алопеции или витилиго, до включения в когорту.

14. Пациенты со стабильной токсичностью ≥ 2 степени от предшествующей противоопухолевой терапии рассматривались в индивидуальном порядке после консультации с медицинским наблюдателем.

15. Когорты 1А, 2А и 3А пациентов с необратимой токсичностью, обострение которой вследствие лечения пембролизумабом обоснованно не ожидалось, были включены только после консультации с медицинским наблюдателем. Только для пациентов в когорте 3В пациенты с подтвержденной диареей или колитом степени ≥ 2 или выше, возникших вследствие предшествующего лечения ингибитором(ами) иммунных контрольных точек CPI, должны были не демонстрировать симптомов в течение по меньшей мере 6 месяцев или иметь нормальные результаты при визуальной оценке колоноскопии после лечения перед резекцией опухоли.

16. Пациенты должны были предоставить письменное разрешение на использование и раскрытие охраняемой медицинской информации.

Критерии исключения

[00753] Пациенты, соответствующие ЛЮБОМУ из следующих критериев, были исключены из исследования:

1. Пациенты с меланомой увеального/глазного происхождения

2. Пациенты, получившие аллотрансплантат органа или предшествующую терапию с переносом клеток, которая включала немиелоаблативную или миелоаблативную химиотерапию, в течение последних 20 лет. (Примечание: этот критерий был применим к пациентам, проходящим повторное лечение TIL, кроме случая, когда они прошли предшествующий режим NMA-LD

до их лечения TIL.)

3. Пациенты с симптоматическими и/или не получавшими лечение метастазами в головной мозг.

• Пациенты, прошедшие радикальное лечение метастазов в головной мозг, будут рассматриваться для включения в исследование

после обсуждения с медицинским наблюдателем; если до начала лечения пациент клинически стабилен в течение ≥ 2 недель, новые поражения головного мозга по данным магнитно-резонансной

визуализации (МРТ) отсутствуют после лечения, и пациенту не требуется

постоянное

лечение кортикостероидами.

4. Пациенты, получающие системную стероидную терапию за 21 день до включения в исследование.

5. Беременные и кормящие пациентки.

6. Пациенты, имевшие активное заболевание(ия), которое, по мнению исследователя, представляло повышенный риск для участия в исследовании; такое как системные инфекции (например, сифилис или любая другая инфекция, требующая применения антибиотиков), нарушения свертывания крови или другие активные значимые заболевания сердечно-сосудистой, дыхательной или иммунной систем.

7. Пациенты не могут иметь активных или ранее подтвержденных аутоиммунных или воспалительных расстройств (включая пневмонию, воспалительное заболевание кишечника [например, колит или болезнь Крона], дивертикулит [за исключением дивертикулеза], системную красную волчанку, саркоидоз или синдром Вегенера [гранулематоз с ангиопатией, болезнь Грейвса, ревматоидный артрит, гипофизит, увеит и т. д.]). Исключениями из этого критерия были следующие:

Пациенты с витилиго или алопецией.

Пациенты с гипотиреозом (например, после синдрома Хашимото), стабильные на гормонозаместительной терапии.

Любое хроническое заболевание кожи, не требовавшее системной терапии.

Пациенты с целиакией, контролируемой только диетой.

8. Пациенты, получившие живую или ослабленную вакцинацию в течение 28 дней до начала лечения.

9. Пациенты с любой формой первичного иммунодефицита (например, тяжелым комбинированным иммунодефицитом [ТКИД] и синдромом приобретенного иммунодефицита [СПИД]).

10. Пациенты с гиперчувствительностью к любому из компонентов исследуемых препаратов в анамнезе. ТП не вводили пациентам с известной гиперчувствительностью к любому компоненту препарата продукта ТП, включая, не ограничиваясь перечисленным, любое из следующего:

- NMA-LD (циклофосфамид, месна и флударабин)

- Proleukin®, альдеслейкин, П-2

- Антибиотики группы аминогликозидов (например, стрептомицин, гентамицин [за исключением пациентов с отрицательной кожной пробой на гиперчувствительность к гентамицину])

- Любой компонент препарата продукта ТП, включая диметилсульфоксид [ДМСО], HSA, П-2 и декстран 40

- Пембролизумаб

11. Пациенты с фракцией выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) <45% или относящиеся ко II или более высокому классу по классификации Нью-Йоркской

кардиологической ассоциации. ЭКГ с нагрузкой, демонстрирующая любые необратимые нарушения движения стенок у любых пациентов в возрасте ≥ 60 лет или у пациентов, имеющих в анамнезе ишемическую болезнь сердца, боль в груди или клинически значимые предсердные и/или желудочковые аритмии.

Пациенты с отклоняющимся от нормы результатом ЭКГ с нагрузкой могли быть включены в исследование, если у них была удовлетворительная фракция выброса и допуск по кардиологии с одобрения медицинского наблюдателя спонсора.

12. Пациенты, имевшие обструктивную или рестриктивную болезнь легких и имеющие документально подтвержденный ОФВ1 (объем форсированного выдоха за 1 секунду) $\leq 60\%$ от прогнозируемой нормы.

- Если пациенту не удавалось провести достоверную спирометрию из-за аномальной анатомии верхних дыхательных путей (например, трахеостомии), для оценки функции легких использовали тест с 6-минутной ходьбой. Пациенты, которые не смогли пройти расстояние по меньшей мере 80% от прогнозируемого для их возраста и пола или продемонстрировали признаки гипоксии в любой момент во время теста ($SpO_2 < 90\%$), исключаются.

13. Пациенты, имевшие другое первичное злокачественное новообразование в течение предыдущих 3 лет (за исключением пациентов, которые не нуждались в лечении или вылечились более 1 года назад, и, по мнению исследователя, не имели значительного риска рецидива, включая, не ограничиваясь перечисленным, немеланомный рак кожи, ПКИС (протоковая карцинома *in situ*), ЛКИС (лобулярная карцинома *in situ*), рак предстательной железы с оценкой по шкале Глисона ≤ 6 или рак мочевого пузыря).

14. Участие в другом клиническом исследовании исследуемого продукта за 21 день до начала лечения.

Конечные точки исследования и запланированные анализы

[00754] Первичные и вторичные конечные точки были проанализированы отдельно по когортам.

Первичные конечные точки:

[00755] ЧОО была определена как доля пациентов, которые достигли подтвержденного ЧО или ПО как наилучшего ответа, согласно оценке исследователей в соответствии с RECIST 1.1 среди выборки для анализа эффективности.

[00756] Объективный ответ оценивали для каждой оценки заболевания, и ЧОО выражали как биномиальную долю с соответствующим двусторонним 90% доверительным интервалом. Первичный анализ для каждой когорты проводился, когда все получившие лечение пациенты в каждой когорте имели возможность наблюдаться в течение 12 месяцев, если только не произошло прогрессирование/пациент не умер или не выбыл из исследования досрочно в течение периода оценки.

[00757] Первичная конечная точка безопасности измерялась по частоте возникновения любых НЯВЛ 3 или более высокой степени в каждой когорте, выраженной в виде биномиальных долей с соответствующим двусторонним 90% доверительным

интервалом.

Вторичные конечные точки:

Эффективность:

[00758] Вторичные конечные точки эффективности были определены следующим образом:

[00759] Частота ПО на основе пациентов, ответивших на лечение, у которых был достигнут подтвержденный ПО согласно оценке исследователей. ЧКЗ была получена как сумма количества пациентов, у которых был достигнут подтвержденный ЧО/ПО или длительное СЗ (по меньшей мере 6 недель), деленная на количество пациентов в выборке для анализа эффективности $\times 100\%$. Частоту ПО и ЧКЗ обобщали с использованием точечной оценки и ее двустороннего 90% доверительного интервала.

[00760] ДО определяли среди пациентов, у которых был достигнут объективный ответ. Ее измеряли с момента удовлетворения критериев первичного ответа (ЧО/ПО) до первой даты, когда был объективно задокументирован рецидив или прогрессирующее заболевание, или до получения последующей противоопухолевой терапии, или до смерти пациента (в зависимости от того, что было зарегистрировано первым). У пациентов, не испытавших ПЗ или не умерших до момента прекращения сбора данных или окончательного закрытия доступа к базе данных, время наступления событий будет цензурировано на последнюю дату проведения адекватной оценки статуса опухоли.

[00761] ВБП определяли как время (в месяцах) от момента лимфодеплеции до ПЗ или смерти по любой причине, в зависимости от того, какое событие наступит раньше. У пациентов, не испытавших ПЗ или не умерших до момента прекращения сбора данных или окончательного закрытия доступа к базе данных, время наступления событий было цензурировано на последнюю дату проведения адекватной оценки статуса опухоли.

[00762] ОВ определяли как время (в месяцах) от момента лимфодеплеции до наступления смерти по любой причине. У пациентов, не умерших на момент прекращения сбора данных или окончательного закрытия доступа к базе данных, время наступления событий было цензурировано на последнюю дату известности их жизненного статуса.

[00763] ДО, ВБП и ОВ были подвергнуты цензурированию справа. Метод Каплана-Мейера будет использован для обобщения конечных точек эффективности, определяемых временем до наступления события. Исходными данными для оценки опухоли было последнее сканирование перед лимфодеплецией для всех когорт.

[00764] Вышеуказанные параметры эффективности будут оценены для соответствующей когорты для субпопуляций, определенных исходными характеристиками заболевания; статус BRAF (только когорты 1А), статус HPV (только когорты 2А), плоскоклеточное или неплоскоклеточное заболевание легких (только когорты 3А и 3В) и статус анти-PD-L1.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с помощью популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИЛ), включающий следующие этапы:

(а) получение и/или прием первой популяции ТИЛ с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии, толстоигольной биопсии, малой биопсии или других средств для получения образца, содержащего смесь опухолевых и ТИЛ-клеток из опухоли НМРЛ у пациента, в том числе из множества фрагментов или биоптатов опухоли;

(с) приведение фрагментов опухоли в контакт с первой средой для культивирования клеток;

(d) проведение начальной экспансии указанной первой популяции ТИЛ в указанной первой среде для культивирования клеток с получением второй популяции ТИЛ, где указанная вторая популяция ТИЛ по меньшей мере в 5 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТИЛ, где указанная первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2;

(е) проведение быстрой экспансии указанной второй популяции ТИЛ во второй среде для культивирования клеток с получением третьей популяции ТИЛ, где указанная третья популяция ТИЛ по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная вторая популяция ТИЛ, через 7 дней после начала быстрой экспансии; где указанная вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, ОКТ-3 (антитело к CD3) и необязательно облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК); и где быструю экспансию проводят в течение 14 дней или менее;

(f) сбор указанной третьей популяции ТИЛ; и

(g) введение терапевтически эффективной части указанной третьей популяции ТИЛ пациенту с НМРЛ;

где НМРЛ является рефрактерным к лечению антителом к PD-1.

2. Способ по п. 1, где получение указанной первой популяции ТИЛ включает метод взятия образцов из множества очагов поражения.

3. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к PD-L2.

4. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

5. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

6. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

7. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

8. Способ по пп. 5-7, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению

химиотерапевтическим агентом.

9. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

10. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

11. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

12. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

13. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

14. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

15. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

16. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

17. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

18. Способ по пп. 14-17, где массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

19. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неоадьювантную или адьювантную терапии.

20. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

21. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

22. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу

или его биоаналогу.

23. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

24. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

25. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

26. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

27. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к атезолизумабу или его биоаналогу.

28. Способ по п. 1, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где начальную экспансию проводят в течение 21 дня или менее.

30. Способ по любому из пп. 1-29, где начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

31. Способ по любому из пп. 1-30, где начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

32. Способ по любому из пп. 1-31, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в указанной первой среде для культивирования клеток.

33. Способ по любому из пп. 1-32, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл в указанной второй среде для культивирования клеток.

34. Способ по любому из пп. 1-33, где начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

35. Способ по любому из пп. 1-34, где быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

36. Способ по любому из пп. 1-35, где указанная первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

37. Способ по любому из пп. 1-36, где указанная вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

38. Способ по любому из пп. 1-37, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту указанной третьей популяции ТИЛ.

39. Способ по п. 38, где режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ в течение двух дней с последующим

введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

40. Способ по любому из пп. 1-39, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима П-2, начиная на следующий день после введения пациенту указанной третьей популяции ТП.

41. Способ по п. 40, где режим П-2 представляет собой высокодозовый режим П-2, включающий 600 000 или 720 000 МЕ/кг альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

42. Способ лечения немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с помощью популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИ), включающий следующие этапы:

(а) резекцию одной или более опухолей у пациента, где указанные одна или более опухолей содержат первую популяцию ТП;

(б) измельчение указанных одной или более опухолей на фрагменты опухоли;

(с) приведение фрагментов опухоли в контакт с первой средой для культивирования клеток;

(д) проведение начальной экспансии указанной первой популяции ТП в указанной первой среде для культивирования клеток с получением второй популяции ТП, где указанная вторая популяция ТП по меньшей мере в 5 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТП, где указанная первая среда для культивирования клеток содержит П-2;

(е) проведение быстрой экспансии указанной второй популяции ТП во второй среде для культивирования клеток с получением третьей популяции ТП, где указанная третья популяция ТП по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная вторая популяция ТП, через 7 дней после начала быстрой экспансии; где указанная вторая среда для культивирования клеток содержит П-2, ОКТ-3 (антитело к CD3) и необязательно облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (МНПК); и где быструю экспансию проводят в течение 14 дней или менее;

(ф) сбор указанной третьей популяции ТП; и

(г) введение терапевтически эффективной части указанной третьей популяции ТП пациенту с НМРЛ;

где НМРЛ является рефрактерным к лечению антителом к PD-1.

43. Способ по п. 42, где опухоль резецируют из одного или более опухолевых очагов.

44. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1, и/или к PD-L1, и/или к PD-L2.

45. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

46. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

47. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

48. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

49. Способ по пп. 46-48, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом.

50. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

51. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

52. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

53. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

54. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

55. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

56. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

57. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

58. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

59. Способ по пп. 55-58, где указанное массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

60. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неoadьювантную или адьювантную терапии.

61. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

62. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

63. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу или его биоаналогу.

64. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

65. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

66. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

67. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

68. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к атезолизумабу или его биоаналогу.

69. Способ по п. 42, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

70. Способ по любому из пп. 42-69, где начальную экспансию проводят в течение 21 дня или менее.

71. Способ по любому из пп. 42-70, где начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

72. Способ по любому из пп. 42-71, где начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

73. Способ по любому из пп. 42-72, где IL-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в указанной первой среде для культивирования клеток.

74. Способ по любому из пп. 42-73, где IL-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл в указанной второй среде для культивирования клеток.

75. Способ по любому из пп. 42-74, где начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

76. Способ по любому из пп. 42-75, где быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

77. Способ по любому из пп. 42-76, где указанная первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

78. Способ по любому из пп. 42-77, где указанная вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21 и их комбинаций.

79. Способ по любому из пп. 42-78, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту указанной третьей популяции ТИЛ.

80. Способ по п. 79, где режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{сут}$ в течение пяти дней.

81. Способ по любому из пп. 42-80, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима ИЛ-2, начиная на следующий день после введения пациенту указанной третьей популяции ТИЛ.

82. Способ по п. 81, где режим ИЛ-2 представляет собой высокодозовый режим ИЛ-2, включающий $600\ 000$ или $720\ 000 \text{ МЕ/кг}$ альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

83. Способ лечения субъекта с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ), где указанный рак является рефрактерным к лечению антителом к PD-1, включающий введение подвергнутых экспансии опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ТИЛ), включая:

(а) получение и/или прием первой популяции ТИЛ из одной или более опухолей, резецированных у субъекта, путем обработки указанных одной или более опухолей, полученных от указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в закрытую систему;

(c) проведение первой экспансии путем культивирования указанной первой популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением второй популяции ТИЛ, где первую экспансию проводят в закрытом контейнере, обеспечивающем первую газопроницаемую площадь поверхности, где первую экспансию проводят в течение приблизительно 3-14 дней с получением указанной второй популяции ТИЛ, где указанная вторая популяция ТИЛ по меньшей мере в 50 раз больше по численности, чем указанная первая популяция ТИЛ, и где переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открытия системы;

(d) проведение второй экспансии путем добавления в среду для культивирования клеток указанной второй популяции ТИЛ добавок ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (АПК) с получением третьей популяции ТИЛ, где вторую экспансию проводят в течение приблизительно 7-14 дней с получением указанной третьей популяции ТИЛ, где указанная третья популяция ТИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТИЛ,

которая содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти по сравнению с указанной второй популяцией ТП, где вторую экспансию проводят в закрытом контейнере, обеспечивающем вторую газопроницаемую площадь поверхности, и где переход от этапа (с) к этапу (d) происходит без открытия системы;

(е) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на этапе (d), где переход от этапа (d) к этапу (е) происходит без открытия системы; и

(f) перенос собранной популяции ТП с этапа (е) в пакет для инфузии, где переход от этапа (е) к (f) происходит без открытия системы;

(g) криоконсервацию пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию ТП с этапа (f), с использованием процесса криоконсервации; и

(h) введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки указанной третьей популяции ТП из пакета для инфузии с этапа (g).

84. Способ по п. 83, где образец опухоли получают методом взятия образцов из множества очагов поражения.

85. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

86. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1.

87. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

88. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

89. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и ранее подвергался лечению химиотерапевтическим агентом.

90. Способ по пп. 87-89, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом.

91. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

92. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

93. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

94. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

95. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению

химиотерапевтическим агентом, и характеризуется низкой экспрессией PD-L1.

96. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее не подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

97. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ ранее подвергался лечению антителом к PD-1 и/или к PD-L1 и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

98. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

99. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ подвергался лечению химиотерапевтическим агентом, но в настоящее время не подвергается лечению химиотерапевтическим агентом, и характеризуется массивным поражением на исходном уровне.

100. Способ по пп. 96-99, где массивное поражение относится к случаям, где максимальный диаметр опухоли превышает 7 см при измерении либо в поперечной, либо во фронтальной плоскости, либо наблюдаются увеличенные лимфатические узлы с размером по короткой оси 20 мм или более.

101. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к по меньшей мере двум предшествующим курсам системного лечения, не включая неоадьювантную или адьювантную терапии.

102. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к антителу к PD-1, выбранному из группы, состоящей из ниволумаба, пембролизумаба, ипилимумаба, JS001, TSR-042, пидилизумаба, BGB-A317, SHR-1210, REGN2810, MDX-1106, PDR001, антитела к PD-1 из клона: RMP1-14; и антител к PD-1, раскрытых в патенте США № 8008449, дурвалумаба, атезолизумаба, авелумаба и их фрагментов, производных, вариантов, а также биоаналогов.

103. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к пембролизумабу или его биоаналогу.

104. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ниволумабу или его биоаналогу.

105. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу.

106. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и пембролизумабу или его биоаналогу.

107. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к ипилимумабу или его биоаналогу и ниволумабу или его биоаналогу.

108. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к дурвалумабу или его биоаналогу.

109. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к

атезолизумабу или его биоаналогу.

110. Способ по п. 83, где рефрактерный НМРЛ является рефрактерным к авелумабу или его биоаналогу.

111. Способ по любому из пп. 83-110, где начальную экспансию проводят в течение 21 дня или менее.

112. Способ по любому из пп. 83-111, где начальную экспансию проводят в течение 14 дней или менее.

113. Способ по любому из пп. 83-112, где начальную экспансию проводят в течение приблизительно 3-11 дней, а вторую экспансию проводят в течение приблизительно 7-11 дней.

114. Способ по любому из пп. 83-113, где начальную экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней, и быструю экспансию проводят в течение приблизительно 11 дней.

115. Способ по любому из пп. 83-114, где IL-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в указанной первой среде для культивирования клеток.

116. Способ по любому из пп. 83-115, где IL-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл в указанной второй среде для культивирования клеток.

117. Способ по любому из пп. 83-116, где начальную экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

118. Способ по любому из пп. 83-117, где быструю экспансию проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

119. Способ по любому из пп. 83-118, где указанная первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 и их комбинаций.

120. Способ по любому из пп. 83-119, где указанная вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 и их комбинаций.

121. Способ по любому из пп. 83-120, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима немиелоаблативной лимфодеплеции перед введением пациенту указанной третьей популяции ТЛ.

122. Способ по п. 121, где режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе 60 мг/м²/сут в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сут в течение пяти дней.

123. Способ по любому из пп. 83-122, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием режима IL-2, начиная на следующий день после введения пациенту указанной третьей популяции ТЛ.

124. Способ по п. 123, где режим IL-2 представляет собой высокодозовый режим

IL-2, включающий 600 000 или 720 000 МЕ/кг альдеслейкина или его биоаналога или варианта, вводимых в виде 15-минутной внутривенной болюсной инфузии каждые восемь часов до достижения толерантности.

По доверенности

1/12

Процесс 2А: приблизительно 22 дня от стадии А до Е**1. ЭТАП А**

Получение образца опухоли пациента

2. ЭТАП В

Фрагментация и первая экспансия

от 3 до 14 дней

3. ЭТАП С

Переход от первой экспансии ко второй экспансии

Без хранения и в закрытой системе

4. ЭТАП D

Вторая экспансия

IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки

Закрытая система

5. ЭТАП Е

Сбор TIL с этапа D

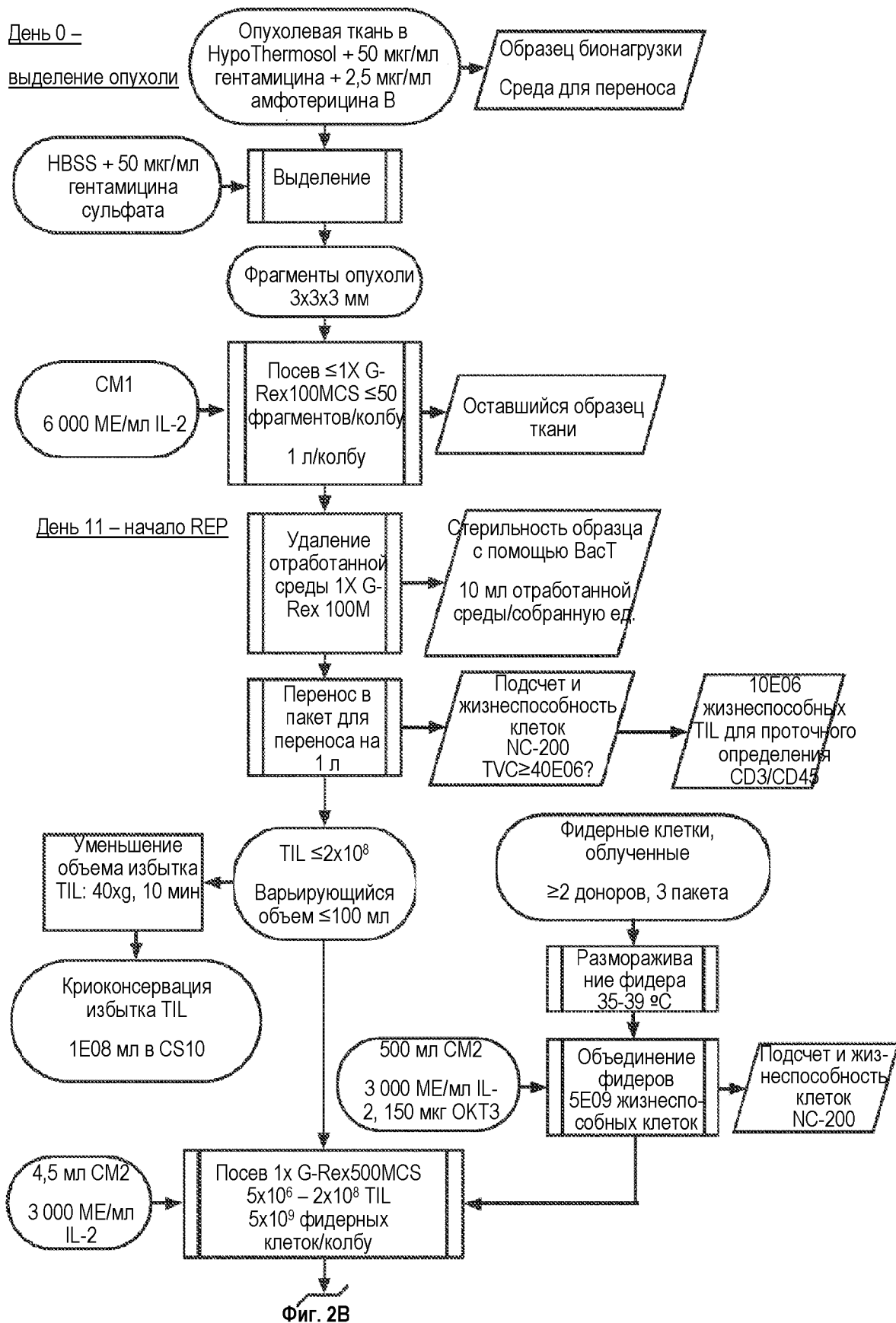
Закрытая система

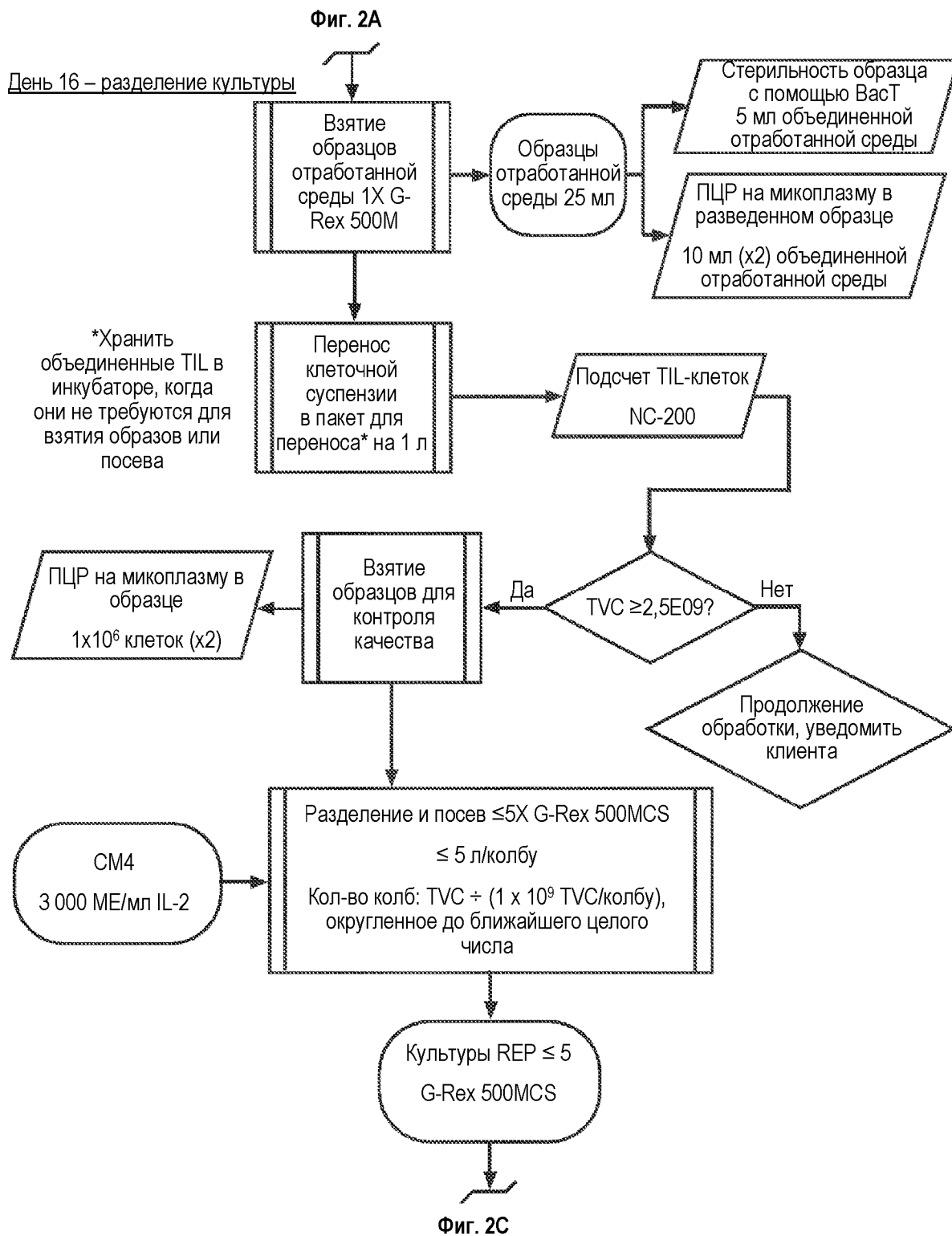
6. ЭТАП F

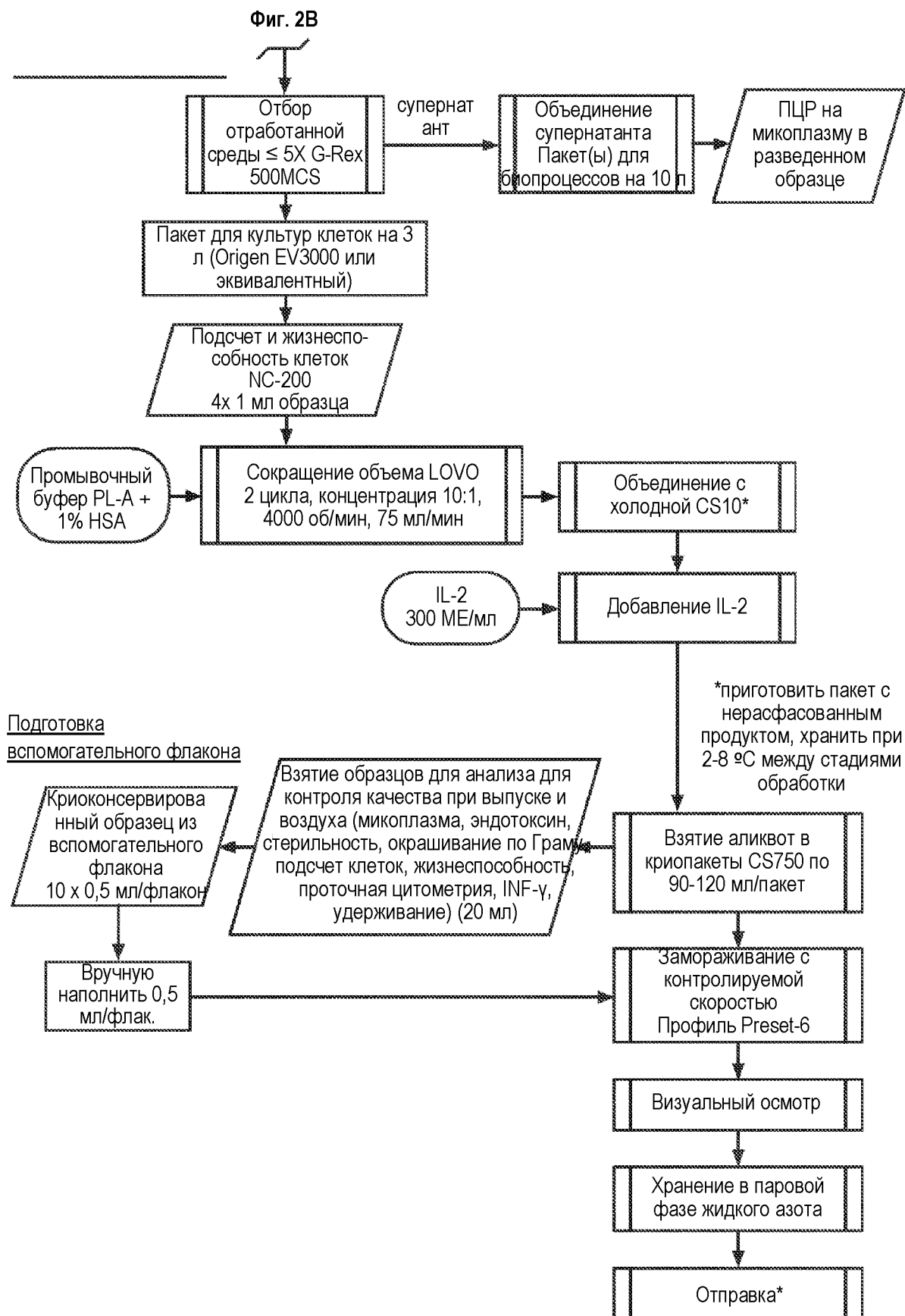
Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии

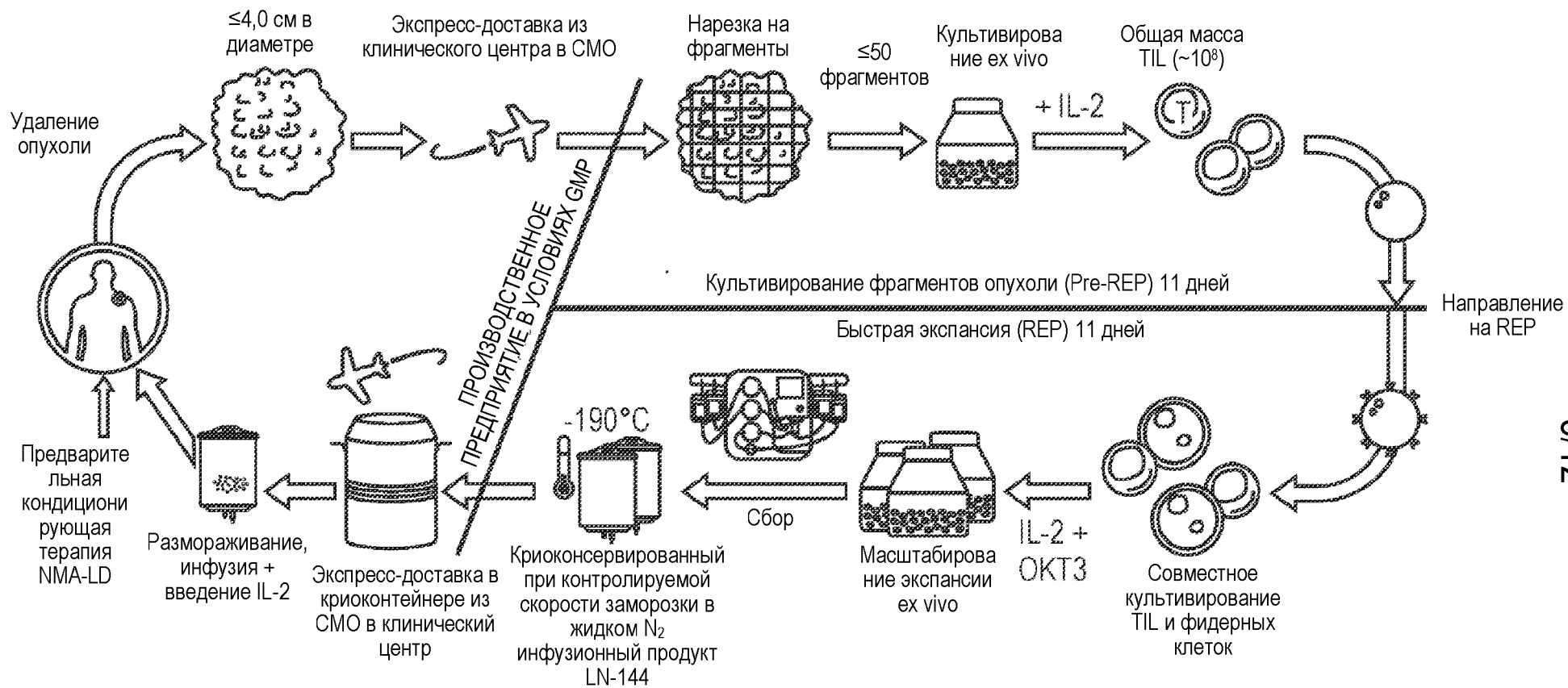
(необязательная криоконсервация)

ФИГ. 1

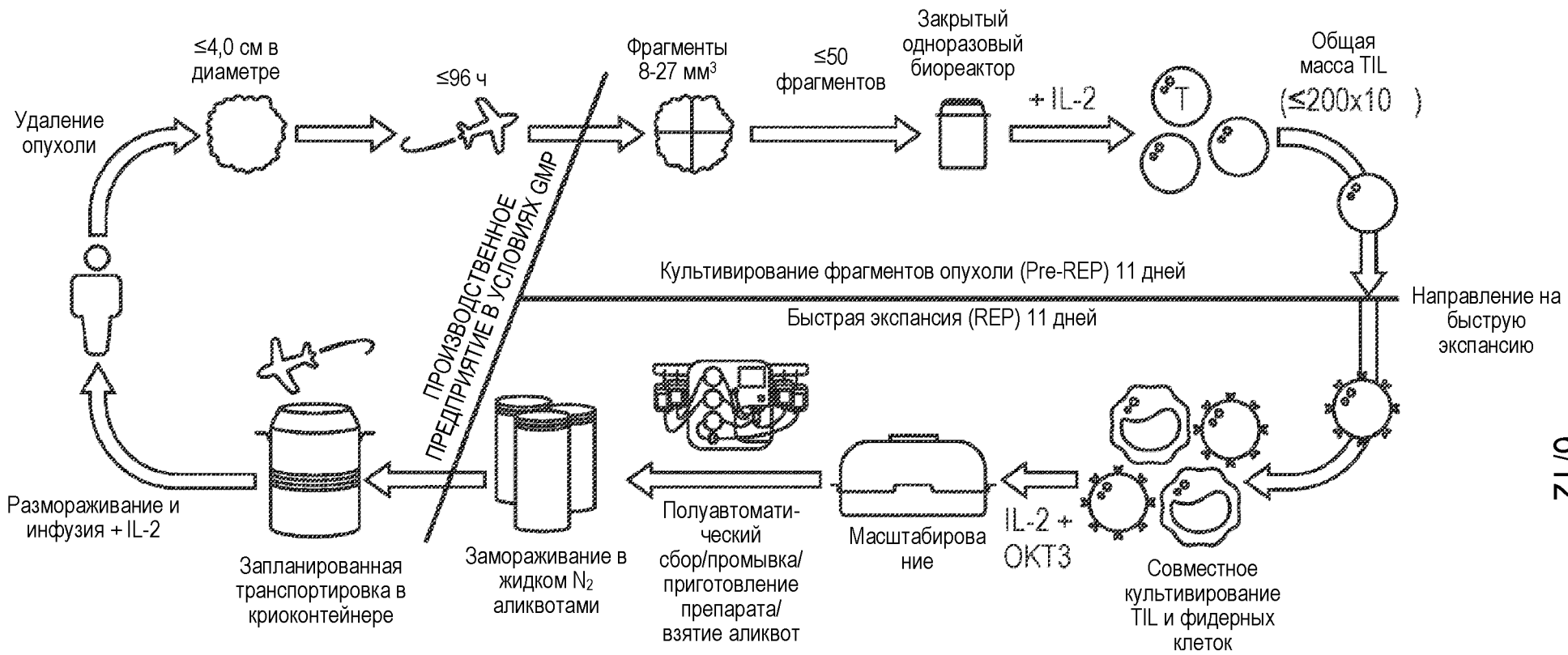








ФИГ. 3

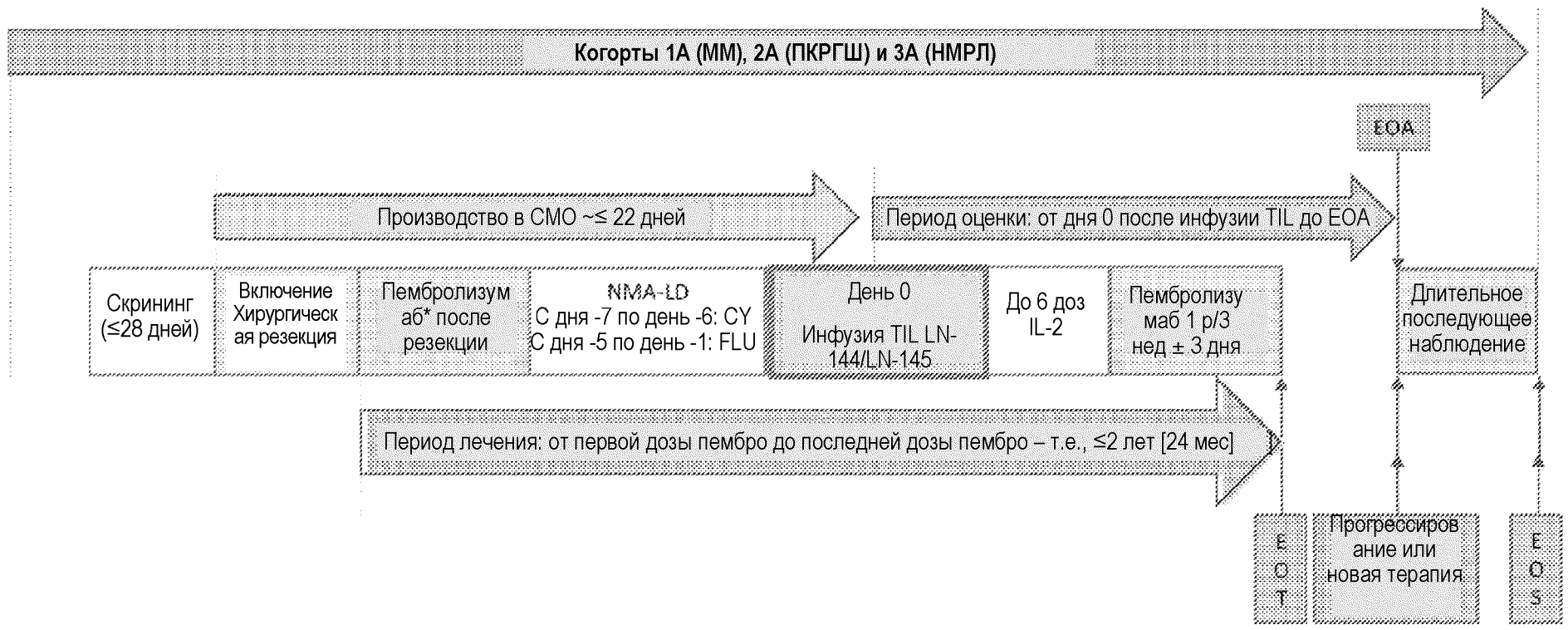


ФИГ. 4

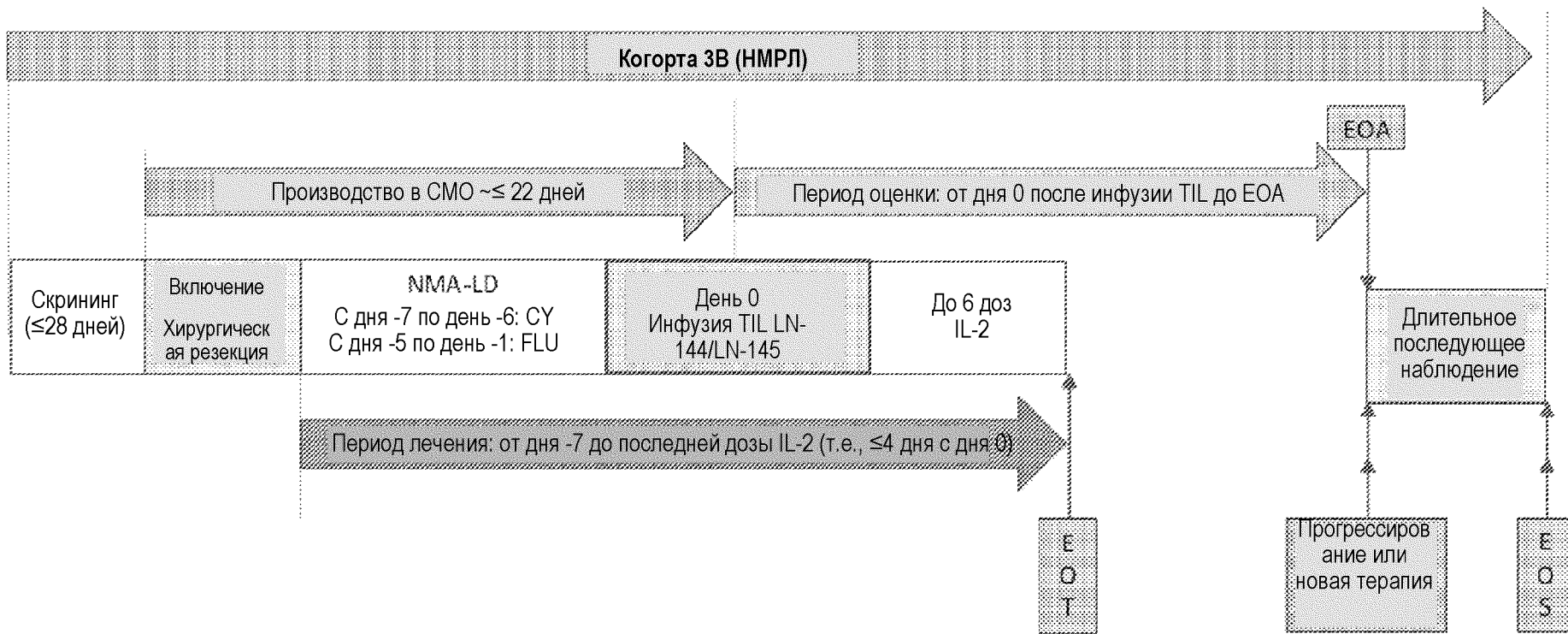
Процесс 1С: 43-55 дней для стадий А-Е	Процесс 2А: приблизительно 22 дня для стадий А-Е
<p align="center">1. ЭТАП А</p> <p align="center">Получение образца опухоли пациента</p>	<p align="center">1. ЭТАП А</p> <p align="center">Получение образца опухоли пациента</p>
<p align="center">2. ЭТАП В</p> <p align="center">Фрагментация и первая экспансия</p> <p align="center">от 11 дней до 21 дня</p>	<p align="center">2. ЭТАП В</p> <p align="center">Фрагментация и первая экспансия</p> <p align="center">от 3 до 14 дней</p>
<p align="center">3. ЭТАП С</p> <p align="center">Переход от первой экспансии ко второй экспансии</p> <p align="center">Необязательное хранение до отбора</p>	<p align="center">3. ЭТАП С</p> <p align="center">Переход от первой экспансии ко второй экспансии</p> <p align="center">Без хранения и в закрытой системе</p>
<p align="center">4. ЭТАП D</p> <p align="center">Вторая экспансия</p> <p align="center">IL-2, ОКТ-3, антигенпрезентирующие фидерные клетки</p> <p align="center">Необязательно повторяют один или более раз</p>	<p align="center">4. ЭТАП D</p> <p align="center">Вторая экспансия</p> <p align="center">IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки</p> <p align="center">Закрытая система</p>
<p align="center">5. ЭТАП E</p> <p align="center">Сбор TIL с этапа D</p>	<p align="center">5. ЭТАП E</p> <p align="center">Сбор TIL с этапа D</p> <p align="center">Закрытая система</p>
<p align="center">6. ЭТАП F</p> <p align="center">Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии</p>	<p align="center">6. ЭТАП F</p> <p align="center">Приготовление готового препарата и/или перенос в пакет для инфузии</p> <p align="center">(необязательная криоконсервация)</p>

ФИГ. 5

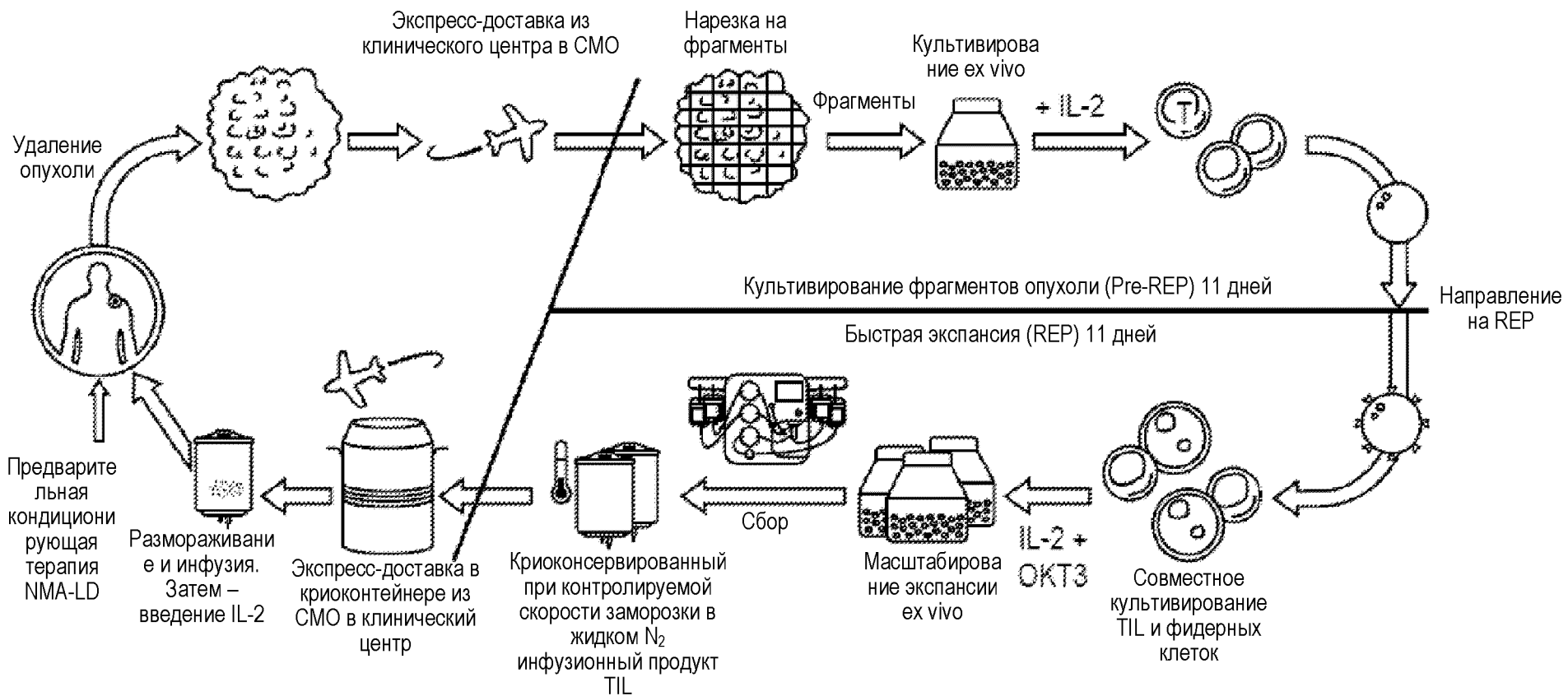
Стадия процесса	Вариант осуществления процесса 1С	Вариант осуществления процесса 2А	Преимущества
Pre-REP	<ul style="list-style-type: none"> 4 фрагмента на 10 колб GREX-10 продолжительность 11-21 день 	<ul style="list-style-type: none"> 40 фрагментов на 1 колбу GREX-100M Продолжительность 11 дней 	<ul style="list-style-type: none"> Увеличенное количество фрагментов опухоли на колбу Сокращенная продолжительность культивирования Уменьшенное количество стадий Подходит для закрытой системы
Переход от pre-REP к REP	<ul style="list-style-type: none"> Pre-REP TIL замораживают до фенотипирования для отбора, затем размораживают для проведения REP (~день 30) для REP требуется $>40 \times 10^6$ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Pre-REP TIL переходят непосредственно в REP на день 11 для REP требуется $25-200 \times 10^6$ TIL 	<ul style="list-style-type: none"> Сокращенный процесс перехода от pre-REP к REP Уменьшенное количество стадий Не требуется отбор путем фенотипирования Подходит для закрытой системы
REP	<ul style="list-style-type: none"> 6 колб GREX-100M в день 0 REP 5×10^6 TIL и 5×10^8 фидерных МНПК на колбу в день 0 REP Разделение на 18-36 колб в день 7 REP Продолжительность 14 дней 	<ul style="list-style-type: none"> 1 колба GREX-500M в день 11 $25-200 \times 10^6$ TIL и 5×10^9 фидерных МНПК в день 11 Разделение на ≤ 6 колб GREX-500M в день 16 Продолжительность 11 дней 	<ul style="list-style-type: none"> Уменьшенное количество стадий Меньшая продолжительность REP Перенос TIL между колбами в закрытой системе Замены среды в закрытой системе
Сбор	<ul style="list-style-type: none"> TIL, собранные центрифугированием 	<ul style="list-style-type: none"> TIL, собранные с помощью автоматической системы для промывки клеток LOVO 	<ul style="list-style-type: none"> Уменьшенное количество стадий Автоматическая промывка клеток Закрытая система Сниженная потеря продукта в процессе промывки
Приготовление готового препарата	<ul style="list-style-type: none"> Свежий продукт в Hypothermosol Один пакет для инфузии Ограниченная стабильность при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> Криоконсервированный продукт в PlasmaLyte-A + 1% HSA и CS10, хранящийся в жидком N_2 Несколько аликвот Более длительная стабильность при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> Широкие возможности транспортировки Гибкое планирование сроков для пациента Более своевременное тестирование при выпуске
Общая предполагаемая продолжительность процесса	<ul style="list-style-type: none"> 43-55 дней 	<ul style="list-style-type: none"> 22 дня 	<ul style="list-style-type: none"> Более короткий цикл до возвращения пациенту



ФИГ. 7

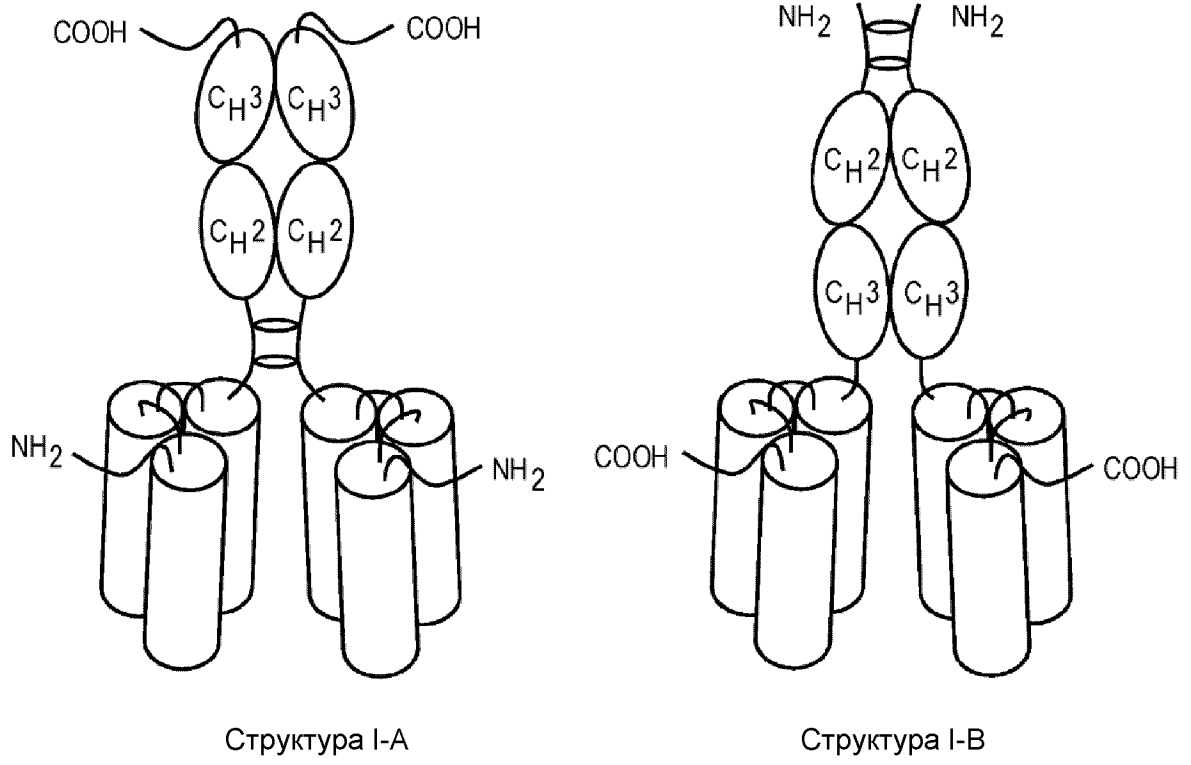


ФИГ. 8



11/12

ФИГ. 9



ФИГ. 10