



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.12.29**

**(21)** Номер заявки  
**201991206**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.11.17**

**(51)** Int. Cl. **C12N 5/0783** (2010.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

**(54) РЕМНАНТНЫЕ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИЕ ЛИМФОЦИТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ**

**(31)** 62/423,750; 62/460,441

**(32)** 2016.11.17; 2017.02.17

**(33)** US

**(43)** 2019.11.29

**(86)** PCT/US2017/062219

**(87)** WO 2018/094167 2018.05.24

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,  
ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Симпсон-Абельсон Мишель Р,  
Мосичук Кристофер, Лотце Майкл Т.  
(US)**

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

**(56)** WO-A1-2015157636  
M.J. BESSER ET AL.: "Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 16, no. 9, 20 April 2010 (2010-04-20), pages 2646-2655, XP055448438, US, ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-10-0041, page 2647-page 2648, page 2650-page 2651; figure 1  
US-A1-2012244133

DUDLEY MARK E. ET AL.: "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma", JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY, US, vol. 23, no. 10, 1 April

2005 (2005-04-01), pages 2346-2357, XP002433186, ISSN: 0732-183X, DOI:10.1200/JCO.2005.00.240, cited in the application, page 2348, page 2350  
WO-A1-2015189356

DUDLEY M.E. ET AL.: "Generation of tumor-infiltrating lymphocyte cultures for use in adoptive transfer therapy for melanoma patients", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 26, no. 4, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 332-342, XP009089890, ISSN: 1524-9557, cited in the application, page 334, page 339-page 341

ROSENBERG S.A. ET AL.: "Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2", JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE, OXFORD UNIVERSITY PRESS, GB, vol. 86, no. 15, 3 August 1994 (1994-08-03), pages 1159-1166, XP009082760, ISSN: 0027-8874, DOI:10.1093/JNCI/86.15.1159, cited in the application, page 1160  
WO-A2-2007103901

US-A1-2016010058  
GLEN M. CHEW ET AL.: "TIGIT Marks Exhausted T Cells, Correlates with Disease Progression, and Serves as a Target for Immune Restoration in HIV and SIV Infection", PLOS PATHOGENS, vol. 12, no. 1, 7 January 2016 (2016-01-07), page e1005349, XP055447824, DOI:10.1371/journal.ppat.1005349, abstract

SIMPSON-ABELSON M.R. ET AL.: "Emigrant pre-REP tumor infiltrating lymphocytes profoundly differ from remnant T-cells", CANCER RESEARCH 20170701 AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH INC. NLD, vol. 77, no. 13, Supplement 1, 1 July 2017 (2017-07-01), XP002778290, ISSN: 1538-7445, abstract

**(57)** В некоторых вариантах осуществления описаны способы введения терапевтически эффективного количества размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, полученных из остатков опухоли, пациенту, который нуждается в этом, с целью лечения рака.

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей международной заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/423750, поданной 17 ноября 2016 г., и предварительной патентной заявки США № 62/460441, поданной 17 февраля 2017 г., полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

В некоторых вариантах осуществления описаны способы и композиции для размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов из остатков опухолей.

### Предпосылки создания изобретения

Лечение генерализованных, рефрактерных форм рака с использованием адоптивного переноса опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) представляет собой эффективный подход к терапии пациентов, имеющих неблагоприятный прогноз. Gattinoni et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393. Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными ОИЛ обеспечивает 55% частоту объективных ответов и длительную регрессию у >25% пациентов с метастатической меланомой. Для успешной иммунотерапии необходимо большое количество ОИЛ, и для коммерциализации данного подхода необходим функциональный и надежный способ. Разработка такого способа была труднодостижимой из-за технических, логистических и нормативных проблем, связанных с размножением клеток. Размножение ОИЛ с применением ИЛ-2, с последующим "процессом быстрого размножения" (ПБР) стало предпочтительным способом размножения ОИЛ благодаря скорости и эффективности процесса. 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. Способы получения ОИЛ из резецированных опухолей включают этап измельчения опухолей на фрагменты размером 1-3 мм<sup>3</sup> и размножение ОИЛ в присутствии интерлейкина 2 (ИЛ-2) на этапе, предвещающем протокол быстрого размножения (этапе пре-ПБР или инициации). На этапе пре-ПБР резидентные иммунциты опухоли мигрируют из опухоли и пролиферируют, и эти ОИЛ подвергают второму процессу ПБР с облученными мононуклеарными клетками периферической крови (МКПК) в качестве питающих клеток, анти-CD3 антителом (ОКТ-3, муромонаб) и ИЛ-2, что приводит к значительному увеличению их количества. До настоящего времени во всех способах размножения ОИЛ остаточные фрагменты опухоли отбрасывают после процесса пре-ПБР.

Прямое ферментативное расщепление резецированных опухолей ранее было изучено в качестве альтернативы пре-ПБР, однако, как сообщалось, при этом было получено меньше культур ОИЛ, что делало процесс получения ОИЛ менее эффективным, чем при использовании пре-ПБР процессов инициации с ИЛ-2. Dudley et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42. Вследствие этого при разработке ОИЛ в качестве терапии против рака расщепление опухолей больше не изучали.

До настоящего времени преобладающее большинство клинических исследований ОИЛ было посвящено изучению ОИЛ, полученных в процессе пре-ПБР и ПБР, при этом были получены весьма скромные клинические результаты, и данная область исследования остается проблематичной, в частности, в вопросе распространения ОИЛ терапии за пределы лечения меланомы на лечение опухолей других видов. Goff et al., J. Clin. Oncol. 2016, 34, 2389-97; Dudley et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Rosenberg et al., Clin. Cancer Res. 2011, 17, 4550-57. Большое внимание было уделено селекции ОИЛ в процессе размножения, либо для отбора конкретных подгрупп клеток (таких как CD8<sup>+</sup> Т-клетки), либо для нацеливания на драйверные мутации, например, мутантный эпитоп ERBB2IP или драйверные мутации в онкогене KRAS. Tran et al., N. Engl. J. Med. 2016, 375, 2255-62; Tran et al., Science 2014, 344, 641-45. Однако такие подходы к селекции, даже если бы их можно было разработать и продемонстрировать эффективность в крупных клинических испытаниях, значительно увеличивают продолжительность, сложность и стоимость проведения ОИЛ терапии и ограничивают возможность широкого использования ОИЛ терапии для разных видов рака. Таким образом, существует острая потребность в разработке способов, позволяющих получать ОИЛ с улучшенными свойствами для использования в противораковой терапии.

Изобретение основано на том неожиданном факте, что ОИЛ с улучшенными свойствами могут быть получены способами, основанными на использовании ремнантных клеток опухоли, и что такие ремнантные ОИЛ (рОИЛ) фенотипически и функционально отличаются от нормальных мигрирующих ОИЛ (мОИЛ). Применение рОИЛ и сочетаний рОИЛ и мОИЛ в иммунотерапии рака обеспечивает значительные преимущества относительно используемых ранее методов лечения на основе мОИЛ.

### Сущность изобретения

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

- (a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);
- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);
- (d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;
- (e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использо-

ванием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ и при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания, и

при этом ткань опухоли выбирают из группы, состоящей из ткани опухоли меланомы, ткани опухоли головы и шеи, ткани опухоли молочной железы, ткани опухоли почки, ткани опухоли поджелудочной железы, ткани опухоли глиобластомы, ткани опухоли легкого, ткани колоректальной опухоли, ткани опухоли саркомы, ткани трижды негативной опухоли молочной железы, ткани опухоли шейки матки, ткани опухоли яичника, а также костного мозга или ткани опухоли при остром миелоидном лейкозе.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания, и

при этом облученные питающие клетки представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивиро-

вания клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом IL-2 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл, и антитело ОКТ-3 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 3 0 нг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом количество по меньшей мере одного Т-клеточного маркера истощения в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках в рОИЛ уменьшено на по меньшей мере 10% в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер LAG3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело

ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 3 раза в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом маркер TIM3 и маркер LAG3 в рОИЛ не поддаются обнаружению методом проточной цитометрии.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом экспрессия CD56<sup>+</sup> в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 3 раза в сравнении с экспрессией CD56<sup>+</sup> в мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом экспрессия CD69<sup>+</sup> в рОИЛ увеличена по меньшей мере в 2 раза в сравнении с экспрессией CD69<sup>+</sup> в мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ).

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом расщепляющая смесь содержит дезоксирибонуклеазу, коллагеназу и гиалуронидазу.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT,

PD-1, а также их сочетания, и

при этом первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, причем рОИЛ получены способом, включающим следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества МОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с МОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество МОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества МОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с МОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество МОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, дважды рефрактерной меланомы, рака яичника, рака шейки матки, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака головы и шеи, почечноклеточного рака, острого миелоидного лейкоза, колоректального рака, саркомы, немелко-



клеточного рака легкого (НМРЛ) и трижды негативного рака молочной железы.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту, при этом режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение пяти дней;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом режим высоких доз IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);
- (d) удаление мОИЛ;
- (e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ и при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

- (a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);
- (d) удаление мОИЛ;
- (e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания, и

при этом ткань опухоли выбирают из группы, состоящей из ткани опухоли меланомы, ткани опухоли головы и шеи, ткани опухоли молочной железы, ткани опухоли почки, ткани опухоли поджелудочной железы, ткани опухоли глиобластомы, ткани опухоли легкого, ткани колоректальной опухоли, ткани опухоли саркомы, ткани трижды негативной опухоли молочной железы, ткани опухоли шейки матки, ткани опухоли яичника, а также костного мозга или ткани опухоли при остром миелоидном лейкозе.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

- (a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);
- (d) удаление мОИЛ;
- (e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетания, и

при этом облученные питающие клетки представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

- (a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования

клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление МОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с МОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом IL-2 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл, и антитело ОКТ-3 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 30 нг/мл.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление МОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с МОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом количество по меньшей мере одного Т-клеточного маркера истощения в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках в рОИЛ уменьшено на по меньшей мере 10% в сравнении с МОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление МОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с МОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер LAG3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с МОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (МОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 3 раза в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD4<sup>+</sup> Т-клетках, и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом маркер TIM3 и маркер LAG3 в рОИЛ не поддаются обнаружению методом проточной цитометрии.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолевые инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использо-

ванием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом экспрессия CD56<sup>+</sup> в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 3 раза в сравнении с экспрессией CD56<sup>+</sup> в мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолю-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом экспрессия CD69<sup>+</sup> в рОИЛ увеличена по меньшей мере в 2 раза в сравнении с экспрессией CD69<sup>+</sup> в мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолю-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом расщепляющая смесь содержит дезоксирибонуклеазу, коллагеназу и гиалуронидазу.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухолю-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело

ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, причем рОИЛ получены способом, включающим следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-

инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, дважды рефрактерной меланомы, рака яичника, рака шейки матки, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака головы и шеи, почечноклеточного рака, острого миелоидного лейкоза, колоректального рака, саркомы, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и трижды негативного рака молочной железы.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту, при этом режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение пяти дней;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолю-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом режим высоких доз ИЛ-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каж-



дые восемь часов до толерантности.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу получения размноженных опухолевых ремнантных клеток, включающих опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ) от пациента, для адоптивной Т-клеточной терапии. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап получения от пациента ткани опухоли, содержащей ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап фрагментирования ткани опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап обработки ткани опухоли в газопроницаемом контейнере средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), а также другими факторами роста Т-клеток или агонистическими антителами, с получением остатков опухоли и размноженных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап удаления размноженных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап ферментативного расщепления остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки. В некоторых вариантах осуществления способ по изобретению может включать этап обработки опухолевых ремнантных клеток средой для культивирования клеток, содержащей облученные питающие клетки, анти-CD3 моноклональное антитело (муромонаб или ОКТ-3) и IL-2, с получением размноженных опухолевых ремнантных клеток. В некоторых вариантах осуществления опухолевые ремнантные клетки, полученные способами по изобретению, могут включать ОИЛ, которые экспрессируют пониженные количества по меньшей мере одного маркера, выбранного из группы, состоящей из TIM3, LAG3, PD-1, а также их сочетания. В некоторых вариантах осуществления ткань опухоли может быть выбрана из группы, состоящей из ткани опухоли меланомы, ткани опухоли головы и шеи, ткани опухоли молочной железы, ткани опухоли почки, ткани опухоли поджелудочной железы, ткани опухоли легкого и ткани колоректальной опухоли.

В одном из вариантов осуществления изобретение может включать способ лечения опухоли у пациента, который нуждается в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления лечение может включать введение терапевтически эффективного количества размноженных опухолевых ремнантных клеток пациенту, причем размноженные опухолевые ремнантные клетки могут быть получены любым из способов, описанных в настоящем документе.

#### Краткое описание фигур

Вышеприведенное краткое описание сущности изобретения, а также следующее далее подробное описание изобретения будут более понятны при прочтении в сочетании с прилагаемыми чертежами.

На фиг. 1 приведена иллюстративная схема приготовления раствора для расщепления опухоли;

на фиг. 2 - иллюстративная подробная схема процедуры расщепления опухоли. В данном примере два способа расщепления применяют одновременно, и клетки высевают отдельно в виде части двух отдельных этапов пре-ПБР для сравнения эффективности этих способов расщепления;

на фиг. 3 показана дифференциальная фенотипическая экспрессия ключевых маркеров в мОИЛ и рОИЛ;

на фиг. 4 представлены результаты исследования мОИЛ и рОИЛ с использованием 2-(N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)амино)-2-дезоксиглюкозы (2-NBDG) (A) и Mitotracker (B) для оценки метаболической емкости перед быстрым размножением;

на фиг. 5 - результаты экспериментов, в которых мОИЛ и рОИЛ стимулировали гранулами с CD3/CD28/4-1BB и брэфелдином A в течение ночи для CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток. ФМА и иономицин добавляли на 4-5 ч. Количество интерферона у оценивали в проточно-цитометрическом анализе для внутриклеточных белков (n=3);

на фиг. 6 - результаты, демонстрирующие, что (A) рОИЛ размножаются и (B) остаются фенотипически отличающимися от мОИЛ в процессе быстрого размножения;

на фиг. 7 приведена схема иллюстративного способа лечения пациента с использованием рОИЛ по изобретению;

на фиг. 8 - иллюстративный временной график для способа лечения пациента с использованием рОИЛ по изобретению;

на фиг. 9 показано разнообразие репертуара TCRvβ (то есть показатель разнообразия) в мОИЛ и рОИЛ;

на фиг. 10 - процентная доля общих CDR3 в мОИЛ и рОИЛ;

на фиг. 11 представлены результаты анализов пролиферации клеток из трижды негативной карциномы молочной железы, колоректальной карциномы, карциномы легкого, карциномы почки и меланомы, демонстрирующие, что мОИЛ либо из CD4<sup>+</sup>, либо из CD8<sup>+</sup>, популяции во всех пяти опухолях проявляли повышенную способность к пролиферации при совместном культивировании с рОИЛ и анти-CD3 антителом, о чем свидетельствует сдвиг (или разбавление красителя), наблюдаемый для красителя Cell-Trace™, в сравнении с одними мОИЛ. Красный цвет соответствует мОИЛ и синий цвет соответствует рОИЛ при совместном культивировании с рОИЛ;

на фиг. 12 - тепловая карта, полученная в анализе NanoString, которая показывает, что профили экспрессии генов для мОИЛ и рОИЛ значительно различаются;

на фиг. 13 - график, построенный по результатам анализа NanoString, который показывает, что экспрессия нескольких генов значительно повышена или понижена в рОИЛ в сравнении с мОИЛ;

на фиг. 14 приведен график клонотипов, показывающий основные 50 CDR3, общих для мОИЛ и рОИЛ (для трех пар мОИЛ/рОИЛ) из карциномы яичника;

на фиг. 15 - график клонотипов, показывающий основные 50 CDR3, общих для мОИЛ и рОИЛ (для трех пар мОИЛ/рОИЛ) из карциномы почки;

на фиг. 16 - график клонотипов, показывающий основные 50 CDR3, общих для мОИЛ и рОИЛ (для трех пар мОИЛ/рОИЛ) из трижды негативной карциномы молочной железы.

#### **Краткое описание списка последовательностей**

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

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

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

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

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

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

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

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

#### **Подробное описание изобретения**

Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Полное содержание всех патентов и публикаций, упомянутых в настоящем документе, включено посредством ссылки.

Определения.

Термины "истощенный фенотип" и "маркер истощения" относятся к клеточным поверхностным маркерам, характерным для истощения Т-клеток в ответ на постоянную стимуляцию Т-клеточного рецептора (TCR) антигеном. Т-клетки, имеющие истощенный фенотип, экспрессируют ингибирующие рецепторы, такие как содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина белок 3 (TIM3 или TIM-3), белок гена активации лимфоцитов 3 (LAG3 или LAG-3), Т-клеточный иммунорецептор с доменами иммуноглобулина и ITIM (TIGIT) и белок программируемой гибели клеток 1 (PD-1), и лишены способности продуцировать эффекторные цитокины и способности осуществлять эффективный иммунный ответ. Истощение в Т-клетках описано в публикации Yi et al., Immunology 2010, 129, 474-81, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

Используемые в настоящем документе термины "совместное введение", "введение совместно с", "введенные в сочетании с", "введение в сочетании с", "одновременное" и "совместное" означают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов субъекту-человеку таким образом, что оба активных фармацевтических ингредиента и/или их метаболиты присутствуют в организме субъекта-человека в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в разные моменты времени 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 средства, также предусмотрено в способах по изобретению.

Термин "in vivo" относится к событию, которое имеет место в организме субъекта.

Термин "in vitro" относится к событию, которое имеет место за пределами организма субъекта. In vitro анализы включают клеточные анализы, в которых используют живые или мертвые клетки, и также могут включать бесклеточные анализы, в которых не используют какие-либо интактные клетки.

Термин "антиген" означает вещество, которое индуцирует иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой молекулу, которая может быть связана антителом или TCR, если она представлена молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС). Используемый в настоящем документе термин "антиген" также охватывает Т-клеточные эпитопы. Кроме того, антиген может быть признан иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления антиген может индуцировать гуморальный иммунный ответ или клеточный иммунный ответ, приводящий к активации В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов. В некоторых случаях для этого может быть необходимо, чтобы антиген содержал или был связан с Th-клеточным эпитопом. Антиген также может иметь один или более эпитопов (например, В- и Т-эпитопов). В некоторых вариантах осуществления антиген, предпочтительно, будет реагировать, как правило, высоко специфическим и избирательным образом с его соответствующим антителом или TCR, но не с множеством других антител или TCR, которые могут быть индуцированы другими антигенами.

Термин "эффективное количество", или "терапевтически эффективное количество", означает количество соединения или сочетания соединений, описанных в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления запланированного воздействия, включая, но без ограничения, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от запланированного применения (*in vitro* или *in vivo*) или от субъекта-человека и болезненного состояния, которое подвергают лечению (например, массы тела, возраста и пола субъекта), степени тяжести болезненного состояния, способа введения и так далее, что может с легкостью определять специалист в данной области. Термин также применяют к дозе, которая будет индуцировать конкретный ответ в клетках-мишенях (например, уменьшение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретного выбранного соединения, назначенного режима дозирования, от того, вводят ли соединение в сочетании с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую его вводят, а также от физической системы доставки, в которой находится соединение. Терапевтически эффективное количество может представлять собой "противоопухолевое эффективное количество" и/или "опухоль-ингибирующее эффективное количество", которое может представлять собой точное вводимое количество композиций по настоящему изобретению, которое может определять врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, размере опухоли, степени инфицирования или метастазирования, а также состояния здоровья пациента (субъекта). В целом, можно указать, что фармацевтическую композицию, содержащую цитотоксические лимфоциты или рОИЛ, описанные в настоящем документе, можно вводить в дозе  $10^4$ - $10^{11}$  клеток/кг массы тела (например,  $10^5$ - $10^6$ ,  $10^5$ - $10^{10}$ ,  $10^5$ - $10^{11}$ ,  $10^6$ - $10^{10}$ ,  $10^6$ - $10^{11}$ ,  $10^7$ - $10^{11}$ ,  $10^7$ - $10^{10}$ ,  $10^8$ - $10^{11}$ ,  $10^8$ - $10^{10}$ ,  $10^9$ - $10^{11}$  или  $10^9$ - $10^{10}$  клеток/кг массы тела), включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Композиции цитотоксических лимфоцитов или рОИЛ также можно вводить в этих дозах множество раз. Цитотоксические лимфоциты или рОИЛ можно вводить методом инфузии, часто используемым при иммунотерапии (смотри, например, Rosenberg et al., N. Eng. J. Med. 319: 1676, 1988). Оптимальную дозу и режим лечения для конкретного пациента может с легкостью определять специалист в области медицины, контролируя у пациента признаки заболевания и соответствующим образом корректируя лечение.

Используемый в настоящем документе термин "терапевтический эффект" означает терапевтическую пользу и/или профилактическую пользу для субъекта-человека. Профилактический эффект включает отсрочку или устранение проявления заболевания или состояния, отсрочку или устранение начала проявления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования заболевания или состояния, либо любое их сочетание.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель", или "фармацевтически приемлемый эксципиент", должен включать любые, и все, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, а также инертные ингредиенты. Использование таких фармацевтически приемлемых носителей, или фармацевтически приемлемых эксципиентов, для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какой-либо общепринятый фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтически приемлемый эксципиент, несовместим с активным фармацевтическим ингредиентом, его использование в терапевтических композициях по изобретению подразумевается. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

Термины "терапия", "лечение", "лечить", и тому подобные, относятся к достижению желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим, заключающимся в полном или частичном предотвращении заболевания, или его симптома, и/или может быть терапевтическим, заключающимся в частичном или полном излечении от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Используемый в настоящем документе термин "лечение" охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает:

- (a) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не диагностирован, как имеющий его;
- (b) ингибирование заболевания, то есть, остановку его развития или прогрессирования; и
- (c) облегчение заболевания, то есть, вызывание регрессии заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания.

"Лечение" также включает доставку средства для обеспечения фармакологического эффекта, даже в отсутствие заболевания или состояния. Например, "лечение" включает доставку композиции, которая вызывает иммунный ответ или приводит к созданию иммунитета в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцины.

Термин "гетерологичные" применительно к фрагментам нуклеиновой кислоты или белка указывает на то, что нуклеиновая кислота или белок содержит две или более подпоследовательности, которые в природе не находятся в такой же связи друг с другом. Например, нуклеиновую кислоту, как правило, получают рекомбинантными методами, при этом две или более последовательностей из не связанных генов объединяют, получая новую функциональную нуклеиновую кислоту, например промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника, или кодирующие области из разных источ-

ников. Аналогично, термин "гетерологичный" белок указывает на то, что белок содержит две или более подпоследовательностей, которые в природе не находятся в такой же связи друг с другом (например, слитый белок).

Термин "быстрое размножение" означает увеличение числа антиген-специфических ОИЛ по меньшей мере примерно в 3 раза (или 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) в течение недели, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 10 раз (или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) в течение недели, или наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно в 100 раз в течение недели. Несколько протоколов для быстрого размножения описаны в настоящем документе.

Используемый в настоящем документе термин "опухоль-инфильтрирующие лимфоциты", или "ОИЛ", означает популяцию клеток, исходно полученную в виде белых клеток крови, которые покидают кровотоки в организме субъекта и мигрируют в опухоль. ОИЛ включают, но без ограничения, CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 CD4<sup>+</sup> Т-клетки, клетки - естественные киллеры, дендритные клетки и М1 макрофаги. ОИЛ включают как первичные, так и вторичные ОИЛ. "Первичные ОИЛ" представляют собой клетки, которые получены из образцов ткани пациента, как описано в настоящем документе (в настоящем документе их иногда называют "свежесобранные"), и "вторичные ОИЛ" представляют собой любые клеточные популяции ОИЛ, которые размножились или пролиферировали, как описано в настоящем документе, включая, но без ограничения, суммарные ОИЛ и размноженные ОИЛ ("ПБР ОИЛ" или "пост-ПБР ОИЛ"). В конкретных вариантах осуществления термин "первичные ОИЛ" может включать рОИЛ и смеси мОИЛ и рОИЛ.

Используемый в настоящем документе термин "популяция клеток" (включая ОИЛ) означает некоторое число клеток, обладающих общими признаками. В целом, популяции обычно содержат количество клеток в диапазоне от  $1 \times 10^6$  до  $1 \times 10^{10}$ , при этом разные популяции ОИЛ содержат разные количества клеток. Например, начальный рост первичных ОИЛ в присутствии ИЛ-2 приводит к получению популяции суммарных ОИЛ, насчитывающей примерно  $1 \times 10^8$  клеток. Размножение в фазе ПБР, как правило, заканчивается при получении популяций, содержащих от  $1,5 \times 10^9$  до  $1,5 \times 10^{10}$  клеток для инфузии.

Термины "моноклеарные клетки периферической крови" и "МКПК" означают клетки периферической крови, имеющие круглое ядро, включая лимфоциты (такие как Т-клетки, В-клетки и NK клетки) и моноциты. Предпочтительно, моноклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови. МКПК представляют собой разновидность антигенпредставляющих клеток.

Используемый в настоящем документе термин "криоконсервированные ОИЛ" означает, что ОИЛ, либо первичные, суммарные, либо размноженные (ПБР ОИЛ), обрабатывают и хранят в диапазоне температур примерно от -150 до -60°C. Общие методы криоконсервирования также описаны в других разделах настоящего документа. Для ясности, "криоконсервированные ОИЛ" отличаются от замороженных образцов ткани, которые могут быть использованы в качестве источника первичных ОИЛ, включающих рОИЛ.

Используемый в настоящем документе термин "размороженные криоконсервированные ОИЛ" означает популяцию ОИЛ (таких как рОИЛ), которая ранее была криоконсервирована, а затем ее температура была повышена до комнатной температуры или выше, включая, но без ограничения, температуру культивирования клеток, или температуру, при которой ОИЛ могут быть введены пациенту.

Термины "идентичность последовательностей", "процент идентичности" и "процент идентичности последовательностей" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям, или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов, или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании (с внесением пробелов, при необходимости) для максимального соответствия, не считая любые консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательности. Процент идентичности можно измерять с использованием программ или алгоритмов для сравнения последовательностей, или путем визуальной инспекции. В данной области известны различные алгоритмы и программы, которые могут быть использованы для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, набор программ BLAST, доступный от Национального центра биотехнологической информации правительства США по сетевому адресу BLAST. Сравнения между двумя последовательностями можно проводить с использованием либо алгоритма BLASTN, либо BLASTP. BLASTN используют для сравнения нуклеотидных последовательностей, в то время как BLASTP используют для сравнения аминокислотных последовательностей. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или MegAlign, доступная от DNASTAR, являются дополнительными общедоступными компьютерными программами, которые могут быть использованы для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области может определять соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретных программ для выравнивания последовательностей. В конкретных вариантах осуществления в программах выравнивания используют параметры по умолчанию.

Термин "консервативные аминокислотные замены" означает модификации аминокислотной последовательности, которые не препятствуют связыванию антитела с антигеном. Консервативные аминокислотные замены включают замену аминокислоты из одного класса аминокислотой из того же класса, при этом класс определяется общими физико-химическими свойствами боковых цепей аминокислот и высокой частотой замен в гомологичных белках, имеющей место в природе, что определяют, например, при помощи стандартной матрицы частоты замен Дейхоффа или матрицы BLOSUM. Были охарактеризованы шесть основных классов боковых цепей аминокислот, и они включают: класс I (Cys); класс II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); класс III (Asn, Asp, Gln, Glu); класс IV (His, Arg, Lys); класс V (Ile, Leu, Val, Met) и класс VI (Phe, Tyr, Trp). Например, замена Asp другим остатком из класса III, таким как Asn, Gln или Glu, представляет собой консервативную замену. Таким образом, предсказанный несущественный аминокислотный остаток в белке предпочтительно заменяют другим аминокислотным остатком из того же класса. Способы идентификации аминокислотных консервативных замен, которые не препятствуют связыванию антигена, хорошо известны в данной области (смотри, например, Brummell et al., *Biochemistry* 1993, 32, 1180-1187; Kobayashi et al., *Protein Eng.* 1999, 12, 879-884 (1999); и Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, 94, 412-417).

"Пегилирование" означает модификацию антитела или слитого белка, или его фрагмента, который, как правило, вступает в реакцию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), например реакционноспособным сложноэфирным или альдегидным производным ПЭГ, в условиях, в которых одна или более ПЭГ-групп присоединятся к антителу или фрагменту антитела. Пегилирование может, например, увеличивать биологическое (например, в сыворотке) время полужизни антитела. Предпочтительно, пегилирование проводят путем реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль" должен охватывать любые формы ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, такие как моно(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. Белок или антитело, которые должны быть пегилированы, могут представлять собой агликозилированные белок или антитело. Методы пегилирования известны в данной области и могут быть применены к антителам по 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.

Термин "ОКТ-3" (другое название в настоящем документе "ОКТЗ") относится к моноклональному антителу, либо его биологическому аналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и охватывает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) и муромонаб, или их варианты с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы или биологические аналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в табл. 1 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур и имеет регистрационный номер ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) и имеет каталожный № 86022706. Анти-CD3 антитела также включают антитела клона УНСТ1 (коммерчески доступные от компании BioLegend, San Diego, CA, USA), также известного как T3 и CD3ε.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности муромонаба

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)				
SEQ ID NO: 1 Муромонаб, тяжелая цепь	QVQLQQSGAE INPSRGYTNV 60	LARPGASVKM TTDKSSSTAY	SCKASGYTFT MQLSSLTSED	RYTMHWVKQR SAVYYCARYY	PGQGLEWIGY DDHYCLDYWG
	QGTTLTVSSA 120	APVCGGTTGS	SVTLGCLVKG	YFPEPVTLTW	NSGSLSSGVH
	TFPAVLQSDL 180	SSTWPSQSIT	CNVAHPASST	KVDKKIEPRP	KSCDKTHTCP
	YTLSSSVTVT PCPAPELLGG 240	KDTLMISRTP	EVTCCVVVDVS	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA
	PSVFLFPPKP KTKPREEQYN 300	VLHQDWLNGK	EYCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPIBPQ
	STYRVVSVLT VYTLPPSRDE 360	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSGGSFFLY
	LTKNQVSLTC SKLTVDKSRW 420	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK 450		
SEQ ID NO: 2 Муромонаб, легкая цепь	QIVLTQSPAI SKLASGVAH 60	MSASPGEKVT	MTCASSSVS	YMNWYQQKSG	TSPKRWIYDT
	FRGSGSGTSY APTVSIFPPS 120	SLTISGMEAE	DAATYYCQQW	SSNPFTFGSG	TKLEINRADT
	SEQLTSGGAS TYSMSSTLTL 180	VVCFLNMFYP	KDINVKWKID	GSERQNGVLN	SWTDQDSKDS
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213				

Термин "IL-2" (другое название в настоящем документе "IL2") означает Т-клеточный фактор роста, известный как интерлейкин-2, и охватывает все формы IL-2, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биологические аналоги и варианты. IL-2 описан, например, в публикациях 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 использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 3). Например, термин IL-2 охватывает человеческие, рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (пролейкин, коммерчески доступный от многих поставщиков в дозе 22 миллиона МЕ во флаконах однократного использования), а также форма рекомбинантного IL-2, коммерчески доступная от CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-209-b), и другие коммерческие эквиваленты от других поставщиков. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) представляет собой не гликозилированную форму человеческого рекомбинантного IL-2 с молекулярной массой примерно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящего для использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 4). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, описанные в настоящем документе, включая пегилированный IL2 в виде пролекарства NKTR-214, доступный от Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 и пегилированный IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в публикации патентной заявки 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 использования по изобретению, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Препараты IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в патенте США № 6706289, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)				
SEQ ID NO: 3 рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK ATELKHLLQCL 60	TQLQLEHLLL	DLQMI LINGIN	NYKNPKLTRM	LTFKRYMPKK
	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 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 5 рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 6 рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTQIIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO: 7 рекомбинантный человеческий IL-15 (rhIL-15)	MNWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCVKTA MKCFLEELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO: 8 рекомбинантный человеческий IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRM RQLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVISI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPCSDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMINQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

Термин "IL-4" (другое название в настоящем документе "IL4") означает цитокин, известный как интерлейкин 4, который продуцируется Th2 Т-клетками, а также эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференциацию необученных хелперных Т-клеток (Th0 клеток) в Th2 Т-клетки. Steinke and Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. При активации IL-4 Th2 Т-клетки затем дополнительно продуцируют IL-4 по механизму положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II, а также индуцирует переключение класса на IgE и экспрессию IgG<sub>1</sub> В-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-4, каталожный № Gibco CTR0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящего для использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 5).

Термин "IL-7" (другое название в настоящем документе "IL7") означает гликозилированный, происходящий из тканей цитокин, известный 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, которые участвуют в передаче серии сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-7, каталожный № Gibco PHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящего для использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 6).

Термин "IL-15" (другое название в настоящем документе "IL15") означает Т-клеточный фактор роста, известный как интерлейкин-15, и охватывает все формы IL-15, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биологические аналоги и варианты. IL-15 описан, например, в публикации Fehniger and Caligiuri, *Blood* 2001, 97, 14-32, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-15 имеет β и γ сигнальные рецепторные субъединицы, общие с IL-2. Рекомбинантный человеческий IL-15 представляет собой одиночную, не гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой остаток метионина) с молекулярной массой 12,8 кДа.

Рекомбинантный человеческий IL-15 коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-15, каталожный № 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-15, подходящего для использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 7).

Термин "IL-21" (другое название в настоящем документе "IL21") означает белок плеiotропного цитокина, известный как интерлейкин-21, и охватывает все формы IL-21, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биологические аналоги и варианты. IL-21 описан, например, в публикации Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется Т-клетками - естественными киллерами и активированными человеческими CD4<sup>+</sup> Т-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-21 представляет собой одиночную, не гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты, с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-21 коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-21, каталожный № 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-21, подходящего для использования по изобретению, приведена в табл. 2 (SEQ ID NO: 8).

Термин "биологический аналог" означает биологическое средство, включая моноклональное антитело или слитый белок, которое обладает высокой степенью сходства с лицензированным в США эталонным биологическим средством, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и для которого отсутствуют клинически значимые отличия между биологическим средством и эталонным средством в отношении безопасности, чистоты и эффективности средства. Кроме того, аналогичное биологическое или "биологически аналогичное" лекарственное средство представляет собой биологическое лекарственное средство, аналогичное другому биологическому лекарственному средству, которое уже было одобрено для применения Европейским агентством по лекарственным средствам. Термин "биологический аналог" также используется в качестве синонима другими национальными и региональными регулирующими органами. Биологические средства или биологические лекарственные средства представляют собой лекарственные средства, которые были созданы или получены из биологического источника, такого как бактерии или дрожжи. Они могут состоять из относительно небольших молекул, например, человеческого инсулина или эритропоэтина, или сложных молекул, например, моноклональные антитела. Например, если эталонным белком IL-2 является альдеслейкин (пролейкин), белок, одобренный для применения регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на альдеслейкин, является "биологически аналогичным" альдеслейкину или является "биологическим аналогом" альдеслейкина. В Европе биологический аналог или "биологически аналогичное" лекарственное средство представляет собой биологическое лекарственное средство, аналогичное другому биологическому лекарственному средству, которое уже было авторизовано для применения Европейским агентством по лекарственным средствам (ЕМА). Соответствующей правовой основой для применения биологических аналогов в Европе является статья 6 регламента (ЕС) № 726/2004 и статья 10(4) директивы 2001/83/ЕС, с последними изменениями, и, таким образом, в Европе биологический аналог может быть авторизован, одобрен для авторизации или направлен на рассмотрение с целью авторизации в соответствии со статьей 6 регламента (ЕС) № 726/2004 и статьей 10(4) директивы 2001/83/ЕС. В Европе уже авторизованное оригинальное биологическое лекарственное средство может быть названо "эталонным лекарственным средством". Некоторые из требований в отношении средства, рассматриваемого в качестве биологического аналога, изложены в руководстве СМР по аналогичным биологическим лекарственным средствам. Кроме того, специальные руководства, относящиеся к средству, включая руководства, относящиеся к биологическим аналогам, представляющим собой моноклональное антитело, предоставляются ЕМА для каждого средства и публикуются на сайте этой организации. Биологический аналог, описанный в настоящем документе, может быть аналогичен эталонному лекарственному средству по качественным характеристикам, биологической активности, механизму действия, профилям безопасности и/или эффективности. Кроме того, биологический аналог может быть использован, или быть предназначен для использования, в лечении тех же патологических состояний, что и эталонное лекарственное средство. Таким образом, биологический аналог, описанный в настоящем документе, может считаться имеющим качественные характеристики, аналогичные, или в высокой степени аналогичные, характеристикам эталонного лекарственного средства. Альтернативно или дополнительно, биологический аналог, описанный в настоящем документе, может считаться имеющим биологическую активность, аналогичную, или в высокой степени аналогичную, активности эталонного лекарственного средства. Альтернативно или дополнительно, биологический аналог, описанный в настоящем документе, может считаться имеющим профиль безопасности, аналогичный, или в высокой степени аналогичный, профилю безопасности эталонного лекарственного средства. Альтернативно или дополнительно, биологический аналог, описанный в настоящем документе, может считаться имеющим эффективность, аналогичную, или в высокой степени аналогичную, эффективности эталонного лекарственного средства. Как описано в настоящем доку-



менте, биологический аналог в Европе сравнивают с эталонным лекарственным средством, которое было авторизовано ЕМА для применения. Однако в некоторых случаях биологический аналог может быть сравнен с биологическим лекарственным средством, которое было авторизовано за пределами Европейской экономической зоны (не-ЕЭЗ авторизованный "компаратор") в определенных исследованиях. Такие исследования включают, например, некоторые клинические и *in vivo* доклинические исследования. Используемый в настоящем документе термин "биологический аналог" также означает биологическое лекарственное средство, которое было, или может быть, сравнено с не-ЕЭЗ авторизованным "компаратором". Некоторые биологические аналоги представляют собой белки, такие как антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и слитые белки. Белковый биологический аналог может иметь аминокислотную последовательность, имеющую незначительные модификации в аминокислотной структуре (включая, например, делеции, добавления и/или замены аминокислот), которые существенно не влияют на функцию полипептида. Биологический аналог может содержать аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности 97% или более, например, 97%, 98%, 99% или 100%, с аминокислотной последовательностью его эталонного лекарственного средства. Биологический аналог может иметь одну или более посттрансляционных модификаций, например, но без ограничения, гликозилирование, окисление, дезамидирование и/или укорочение, которая/которые отличается/отличаются от посттрансляционных модификаций эталонного лекарственного средства, при условии, что различия не приводят к изменению безопасности и/или эффективности лекарственного средства. Биологический аналог может иметь идентичный или отличающийся паттерн гликозилирования в сравнении с эталонным лекарственным средством. В частности, но не исключительно, биологический аналог может иметь отличающийся паттерн гликозилирования, если отличия приводят к устранению, или должны приводить к устранению, проблем безопасности, связанных с эталонным лекарственным средством. Кроме того, биологический аналог может отличаться от эталонного лекарственного средства, например, по эффективности, фармацевтической форме, препарату, эксципиентам и/или форме выпуска, при условии, что безопасность и эффективность лекарственного средства не меняются в худшую сторону. Биологический аналог может иметь отличия, например, в фармакокинетическом (ФК) и/или фармакодинамическом (ФД) профилях, от эталонного лекарственного средства, однако он все-еще считается достаточно аналогичным эталонному лекарственному средству, чтобы быть авторизованным или считаться подходящим для авторизации. В определенных обстоятельствах биологический аналог демонстрирует отличающиеся характеристики связывания по сравнению с эталонным лекарственным средством, при этом отличающиеся характеристики связывания не считаются регулирующими органами, такими как ЕМА, препятствием для авторизации в качестве аналогичного биологического средства. Термин "биологический аналог" также используется в качестве синонима другими национальными и региональными регулирующими органами.

Используемый в настоящем документе термин "вариант" включает, но не ограничивается ими, антитела или слитые белки, которые содержат аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности эталонного антитела одной или более заменами, делециями и/или добавлениями в некоторых положениях внутри или по краям аминокислотной последовательности эталонного антитела. Вариант может иметь одну или более консервативных замен в его аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью эталонного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену на одинаково заряженные или незаряженные аминокислоты. Вариант сохраняет способность эталонного антитела специфически связывать антиген. Термин "вариант" также охватывает пегилированные антитела или белки.

"Пегилирование" означает модификацию антитела, или его фрагмента, который, как правило, вступает в реакцию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), например, реакционноспособным сложноэфирным или альдегидным производным ПЭГ, в условиях, в которых одна или более ПЭГ-групп присоединяются к антителу, фрагменту антитела или белку. Пегилирование может, например, увеличивать биологическое (например, в сыворотке) время полужизни антитела или белка. Предпочтительно, пегилирование проводят путем реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). Используемый в настоящем документе термин "полиэтиленгликоль" должен охватывать любые формы ПЭГ, которые были использованы для дериватизации других белков, такие как моно ( $C_1$ - $C_{10}$ ) алкокси- или арилокси-полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль-малеинимид. Антитело, или белок, которое должно быть пегилировано, может представлять собой агликозилированное антитело. Методы пегилирования известны в данной области и могут быть применены к антителам по изобретению, как описано, например, в Европейских патентах № EP 0154316 и EP 0401384.

Термин "гематологическое злокачественное новообразование" относится к формам рака и опухолям гемопозитических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но без ограничения, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также называют "жидкими опухолями". Гематологические злокачественные новообразования включают, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелколимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хрониче-

ский миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМоЛ), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин "В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование" относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, затрагивающим В-клетки.

Термин "солидная опухоль" означает аномальную массу ткани, которая, как правило, не содержит кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин "солидная злокачественная опухоль" относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Злокачественные солидные опухоли включают, но без ограничения, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Структура ткани солидных опухолей включает взаимосвязанные тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, среди которых распределены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую среду.

Термин "жидкая опухоль" означает аномальную массу клеток, которая по своей природе является жидкой. Жидкие злокачественные новообразования включают, но без ограничения, лейкозы, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные новообразования. ОИЛ, полученные из жидких опухолей, в настоящем документе также могут быть названы инфильтрирующими костный мозг лимфоцитами (ИКМЛ).

Используемый в настоящем документе термин "микросреда" может относиться к микросреде солидной или гематологической опухоли в целом, или к отдельной подгруппе клеток в этой микросреде. Используемый в настоящем документе термин "микросреда опухоли" означает сложную смесь "клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических внешних стимулов, способствующих неопластической трансформации, поддерживающих рост и инвазию опухоли, защищающих опухоль от иммунной системы хозяина, стимулирующих терапевтическую резистентность и обеспечивающих ниши для развития основных метастазов", как описано в Swartz et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны узнаваться Т-клетками, уничтожение опухоли за счет иммунной системы является редким событием из-за иммунной супрессии, создаваемой микросредой опухоли.

Используемые в настоящем документе термины "фрагментирование", "фрагмент" и "фрагментированные" описывают методы разрушения опухоли, включая механические методы фрагментирования, такие как дробление, разрезание, разделение и разрушение опухолевой ткани, а также любой другой метод разрушения физической структуры опухолевой ткани.

Термины "примерно" и "приблизительно" означают "в пределах статистически значимого диапазона величины". 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 указанного значения или диапазона. Допустимая вариация, охваченная терминами "примерно" или "приблизительно", зависит от конкретной изучаемой системы, и может быть с легкостью определена специалистом в данной области. Кроме того, используемые в настоящем документе термины "примерно" и "приблизительно" означают, что расстояния, размеры, составы, параметры, формы, а также другие количественные показатели и характеристики, не являются и не обязательно должны быть точными, но могут быть примерными и/или большими или меньшими, при необходимости, отражая допустимые отклонения, коэффициенты пересчета, округление значений, погрешности измерений и тому подобное, а также другие факторы, известные специалистам в данной области. Как правило, расстояния, размеры, составы, параметры, формы, а также другие количественные показатели и характеристики, являются "примерными" или "приблизительными", независимо от того, указано ли это специально. Следует отметить, что для вариантов осуществления с разными размерами, формами и пропорциями можно использовать описанные условия.

Переходные термины "включающий", "состоящий в основном из" и "состоящий из" при использовании в прилагаемой формуле изобретения, в исходной и измененной форме, определяют объем пункта формулы в отношении того, какие из не перечисленных дополнительных элементов или этапов пункта формулы, при наличии, исключены из объема пункта(ов) формулы. Термин "включающий" должен быть инклюзивным, или открытым, и не должен исключать какой-либо дополнительный, не перечисленный элемент, способ, этап или материал. Термин "состоящий из" исключает любой элемент, этап или материал, отличный от тех, которые указаны в пункте формулы, и, в последнем случае, примеси, обычно связанные с указанным материалом(ами). Термин "состоящий в основном из" ограничивает объем пункта формулы указанными элементами, этапами или материалом(ами), а также теми, которые существенно не влияют на базовую и новую(новые) характеристики заявленного изобретения. Все композиции, способы и наборы, описанные в настоящем документе, которые являются составной частью настоящего изобретения, могут, в альтернативных вариантах осуществления, быть более конкретно определены любым из переходных терминов "включающий", "состоящий в основном из" и "состоящий из".

Во избежание сомнений, в настоящем документе предполагается, что конкретные признаки (например, целые числа, характеристики, значения, варианты применения, заболевания, формулы, соединения или группы), описанные в связи с конкретным аспектом, вариантом осуществления или примером по

изобретению, следует воспринимать, как применимые к любому другому аспекту, варианту осуществления или примеру, описанному в настоящем документе, за исключением случаев их несовместимости. Таким образом, такие признаки могут быть использованы, когда это целесообразно, в сочетании с любым из определений, пунктов формулы изобретения или вариантов осуществления, описанных в настоящем документе. Все из признаков, раскрытых в настоящей спецификации (включая любые сопроводительные пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), и/или все из этапов любого раскрытого способа или процесса, могут быть объединены в любом сочетании, за исключением сочетаний, в которых по меньшей мере некоторые из признаков и/или этапов являются взаимоисключающими. Изобретение не ограничено какими-либо деталями любого из раскрытых вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любой новый признак, или новое сочетание признаков, раскрытых в настоящей спецификации (включая любые сопроводительные пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), или на любой новый этап, или любое новое сочетание этапов, любого из раскрытых способов или процессов.

Способы размножения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу размножения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) после расщепления опухоли, как описано в настоящем документе.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу размножения рОИЛ, включающему создание контакта популяции рОИЛ, содержащей по меньшей мере один рОИЛ, с IL-2, в результате чего происходит размножение рОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу размножения популяции рОИЛ, включающему этапы, описанные в публикации Jin et al., J. Immunotherapy 2012, 35, 283-292, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, опухоль можно помещать в среду с ферментами и механически фрагментировать ее в течение примерно 1 мин. Затем смесь можно инкубировать в течение 30 мин при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, а затем вновь механически фрагментировать в течение примерно 1 мин. После инкубации в течение 30 мин при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> опухоль можно механически фрагментировать в третий раз в течение примерно 1 мин. Если после третьего механического разрушения все-еще присутствуют крупные куски ткани, образец можно подвергать 1 или 2 дополнительным этапам механического разрушения, используя или не используя дополнительные 30 мин инкубации при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После завершения последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое число эритроцитов или мертвых клеток, можно проводить разделение в градиенте плотности фиколла для удаления этих клеток. Культивирование ОИЛ можно начинать в 24-луночных планшетах (Costar, 24-луночные планшеты для культивирования клеток, плоскодонные; Corning Incorporated, Corning, NY), в каждую лунку можно высевать  $1 \times 10^6$  клеток из расщепленной опухоли или один опухолевый фрагмент размером примерно 1-8 мм<sup>3</sup> в 2 мл полной среды (СМ) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). СМ состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, с добавлением 10% человеческой АВ сыворотки, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. Культивирование можно начинать в газопроницаемых флаконах емкостью 40 мл и с 10-см<sup>2</sup> газопроницаемым силиконовым дном (G-Rex 10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton), в каждый флакон можно помещать  $10\text{-}40 \times 10^6$  жизнеспособных клеток расщепленной опухоли или 5-30 опухолевых фрагментов в 10-40 мл СМ с IL-2. G-Rex 10 и 24-луночные планшеты можно инкубировать в инкубаторе с увлажненной атмосферой при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, через 5 дней после начала культивирования половину среды можно удалять и заменять свежей средой СМ с IL-2, и после дня 5 половину среды можно заменять каждые 2-3 дня. Протокол быстрого размножения (ПБР) ОИЛ можно выполнять с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых мешков или газопроницаемых флаконов G-Rex, как описано в другом разделе настоящего документа. Для ПБР во флаконах T-175  $1 \times 10^6$  рОИЛ можно суспендировать в 150 мл среды в каждом флаконе. рОИЛ можно культивировать в смеси 1:1 сред СМ и AIM-V (среда 50/50) с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ-3). Флаконы T-175 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Половину среды можно заменять в день 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В день 7 клетки из 2 флаконов T-175 можно объединять в 3-л мешке, и 300 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2 можно добавлять к 300 мл суспензии ОИЛ. Число клеток в каждом мешке можно подсчитывать каждый день или раз в два дня, и можно добавлять свежую среду для поддержания числа клеток на уровне от 0,5 до  $2,0 \times 10^6$  клеток/мл. Для ПБР во флаконах емкостью 500 мл с 100-см<sup>2</sup> газопроницаемым силиконовым дном (например, G-Rex 100, Wilson Wolf Manufacturing, описанных в другом разделе настоящего документа),  $5 \times 10^6$  или  $10 \times 10^6$  ОИЛ можно культивировать в 400 мл среды 50/50 с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ-3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. В день пять, 250 мл супернатанта можно отбирать, помещать в центрифужные стаканы и центрифугировать при 1500 об/мин (491 д) в течение 10 мин. Полученные осадки ОИЛ можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и вновь вносить во флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно во флаконах G-Rex 100, в день семь ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию можно разделять на три 100-мл аликвоты, которые можно использовать для засе-

вания 3 флаконов G-Rex 100. Затем в каждый флакон можно добавлять примерно 150 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2. Флаконы G-Rex 100 затем можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, и через четыре дня 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. После этого ПБР можно завершать, собирая клетки в день 14 культивирования.

В одном из вариантов осуществления способ размножения клеток, или лечения рака, включает этап получения ОИЛ из образца опухоли пациента. Образец опухоли пациента может быть получен способами, известными в данной области. Например, можно получать культуру ОИЛ из ферментативных гидролизатов опухоли и фрагментов опухоли (размером от примерно 1 до примерно 8 мм<sup>3</sup>), полученных во время острого иссечения. Такие гидролизаты опухоли можно получать путем инкубации образцов в ферментной среде (например, буферной среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, содержащей 2 mM глутамат, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы), с последующим механическим разрушением (например, с использованием гомогенизатора для тканей). Гидролизаты опухоли можно получать, помещая опухоль в ферментную среду и механически фрагментируя опухоль в течение примерно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 мин при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, за которой следуют повторные циклы механического разрушения и инкубации в вышеуказанных условиях до того момента, когда будут присутствовать лишь небольшие кусочки ткани. После завершения процесса, если клеточная суспензия содержит большое число эритроцитов или мертвых клеток, можно проводить разделение в градиенте плотности разветвленного гидрофильного полисахарида фикола для удаления этих клеток. Можно использовать альтернативные способы, известные в данной области, такие как те, которые описаны в публикации патентной заявки США № 2012/0244133 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Любой из вышеуказанных способов можно использовать в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе для способов размножения ОИЛ или способов лечения рака.

В одном из вариантов осуществления ПБР рОИЛ можно проводить в газопроницаемом контейнере любым подходящим способом. Например, рОИЛ можно быстро размножить с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина-2 (IL-2), интерлейкина-15 (IL-15) и/или интерлейкина-21 (IL-21), как описано, например, в публикациях международных патентных заявок № WO 2015/189356 A1 и WO 2015/189356 A1, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Неспецифический стимул для Т-клеточных рецепторов может включать, например, ОКТ-3 в концентрации примерно 30 нг/мл, моноклональное анти-CD3 антитело (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Raritan, NJ, USA или Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA). ОИЛ можно быстро размножить путем дополнительной стимуляции ОИЛ *in vitro* одним или более антигенами (включая их антигенные фрагменты, такие как эпитоп(ы)) раковых клеток, которые могут, необязательно, экспрессироваться с вектора, например, пептидом, связывающим человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), например 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L), или gp100:209-217 (210M), необязательно, в присутствии фактора роста Т-клеток, например, IL-2 или IL-15, в концентрации 300 МЕ/мл. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназу, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2, или их антигенные фрагменты. ОИЛ также можно быстро размножить путем повторной стимуляции тем же антигеном(ами) рака на HLA-A2-экспрессирующих антигенпредставляющих клетках. Альтернативно, ОИЛ также можно повторно стимулировать, например, облученными, аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2<sup>+</sup> аллогенными лимфоцитами и IL-2.

В одном из вариантов осуществления способ размножения ОИЛ может включать использование от примерно 5000 мл до примерно 25000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 5000 мл до примерно 10000 мл среды для культивирования клеток или от примерно 5800 мл до примерно 8700 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления способ размножения ОИЛ может включать использование от примерно 1000 мл до примерно 2000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 2000 мл до примерно 3000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 3000 мл до примерно 4000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 4000 мл до примерно 5000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 5000 мл до примерно 6000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 6000 мл до примерно 7000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 7000 мл до примерно 8000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 8000 мл до примерно 9000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 9000 мл до примерно 10000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 10000 мл до примерно 15000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 15000 мл до примерно 20000 мл среды для культивирования клеток или от примерно 20000 мл до примерно 25000 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления способа размножения ОИЛ используют не более одного вида среды для культивирования клеток. Можно использовать любую подходящую среду для культивирования клеток, например, среду для культивирования клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицин сульфат и 10 мкМ гентамицин сульфат) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). В этом отношении патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения ОИЛ. В одном из вариантов осуществления размножение ОИЛ может включать подпитку клеток не чаще, чем каждый третий или

четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

В одном из вариантов осуществления быстрое размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера. Такие варианты осуществления позволяют популяциям клеток размножаться от уровня примерно  $5 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> до уровня  $10 \times 10^6$  -  $30 \times 10^6$  клеток/см<sup>2</sup>. В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без подпитки. В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без подпитки, пока среда остается на высоте примерно 10 см в газопроницаемом флаконе. В одном из вариантов осуществления размножение происходит без подпитки, но при добавлении одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления цитокин можно добавлять в виде болуса, без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области и были использованы для размножения ОИЛ, они включают те, которые описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0377739 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2014/210036 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации патентной заявки США № US 2011/0136228 A1, патенте США № 8809050, публикации международной патентной заявки № WO 2011/072088 A2, публикации патентной заявки США № US 2016/0208216 A1, публикации патентной заявки США № US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2012/129201 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0102075 A1, патенте США № 8956860, публикации международной патентной заявки № WO 2013/173835 A1 и публикации патентной заявки США № US 2015/0175966 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие способы также описаны в публикации Jin et al., J. Immunotherapy 2012, 35, 283-292, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 10 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер имеет 10 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер может содержать 40 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 100-300 миллионов ОИЛ после 2 смен среды.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 100 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер имеет 100 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер может содержать 450 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 1-3 миллиарда ОИЛ после 2 смен среды.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 100M (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер имеет 100 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер может содержать 1000 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 1-3 миллиарда ОИЛ без замены среды.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 100L (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер имеет 100 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер может содержать 2000 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 1-3 миллиарда ОИЛ без замены среды.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой 24-луночный планшет G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой планшет с лунками, при этом каждая лунка имеет 2 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой планшет с лунками, при этом каждая лунка может содержать 8 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 20-60 миллионов клеток на лунку после 2 смен среды.

В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой 6-луночный планшет G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой планшет с лунками, при этом каждая лунка имеет 10 см<sup>2</sup> газопроницаемой поверхности для культивирования. В одном из вариантов осуществления газопроницаемый контейнер представляет собой планшет с лунками, при этом каждая лунка может содержать 40 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления в газопроницаемом контейнере получают 100-300 миллионов клеток на лунку после 2 смен среды.

В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефилтрованной. Использование нефилтрованной среды для

культивирования клеток может упрощать процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанол (BME).

В одном из вариантов осуществления период времени, затрачиваемый на способ, включающий получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток; получение ОИЛ из образца опухолевой ткани; размножение ОИЛ во втором газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток, составляет от примерно 14 до примерно 42 дней, например, примерно 28 дней.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и МКПК на этапе быстрого размножения составляет примерно 1 к 25, примерно 1 к 50, примерно 1 к 100, примерно 1 к 125, примерно 1 к 150, примерно 1 к 175, примерно 1 к 200, примерно 1 к 225, примерно 1 к 250, примерно 1 к 275, примерно 1 к 300, примерно 1 к 325, примерно 1 к 350, примерно 1 к 375, примерно 1 к 400 или примерно 1 к 500. В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и МКПК на этапе быстрого размножения составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и МКПК на этапе быстрого размножения составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (рОИЛ:МКПК) выбирают из группы, состоящей из 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:35, 1:40, 1:45, 1:50, 1:55, 1:60, 1:65, 1:70, 1:75, 1:80, 1:85, 1:90, 1:95, 1:100, 1:105, 1:110, 1:115, 1:120, 1:125, 1:130, 1:135, 1:140, 1:145, 1:150, 1:155, 1:160, 1:165, 1:170, 1:175, 1:180, 1:185, 1:190, 1:195, 1:200, 1:225, 1:250, 1:275, 1:300, 1:350, 1:400, 1:450 и 1:500. В предпочтительном варианте осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (рОИЛ:МКПК) составляет примерно 1:90. В предпочтительном варианте осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (рОИЛ:МКПК) составляет примерно 1:95. В предпочтительном варианте осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (ОИЛ:МКПК) составляет примерно 1:100. В предпочтительном варианте осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (ОИЛ:МКПК) составляет примерно 1:105. В предпочтительном варианте осуществления соотношение рОИЛ и МКПК (ОИЛ:МКПК) составляет примерно 1:110.

В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток также содержит IL-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1000 МЕ/мл, примерно 1500 МЕ/мл, примерно 2000 МЕ/мл, примерно 2500 МЕ/мл, примерно 3000 МЕ/мл, примерно 3500 МЕ/мл, примерно 4000 МЕ/мл, примерно 4500 МЕ/мл, примерно 5000 МЕ/мл, примерно 5500 МЕ/мл, примерно 6000 МЕ/мл, примерно 6500 МЕ/мл, примерно 7000 МЕ/мл, примерно 7500 МЕ/мл или примерно 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 8000 МЕ/мл IL-2.

В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл и примерно 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 одном из вариантов осуществления способ быстрого размножения ОИЛ можно осуществлять с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42), или газопроницаемых емкостей для культивирования (флаконов G-Rex, коммерчески доступных от компании Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Для быстрого размножения ОИЛ во флаконах T-175  $1 \times 10^6$  ОИЛ, суспендированных в 150 мл среды, можно добавлять в каждый флакон T-175. ОИЛ можно культивировать в смеси 1:1 сред CM и AIM-V, с добавлением 3000 МЕ (международных единиц) IL-2 на мл и 30 нг анти-CD3 антитела (например, ОКТ-3) на мл. Флаконы T-175 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Половину среды можно заменять в день 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В день 7 клетки из двух флаконов T-175 можно объединять в 3-литровом мешке, и 300 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2 добавлять к 300 мл суспензии ОИЛ. Число клеток в каждом мешке можно подсчитывать каждый день или раз в два дня, и свежую среду добавлять для поддержания числа клеток на уровне  $0,5-2,0 \times 10^6$  клеток/мл.

В одном из вариантов осуществления для быстрого размножения ОИЛ в газопроницаемых флако-

нах емкостью 500 мл с 100-см<sup>2</sup> газопроницаемым силиконовым дном (G-Rex 100, коммерчески доступны от компании Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10<sup>6</sup> или 10×10<sup>6</sup> ОИЛ можно культивировать в среде 50/50 с добавлением 5% человеческой АВ сыворотки, 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 (ОКТ-3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. В день 5250 мл супернатанта можно отбирать, помещать в центрифужные стаканы и центрифугировать при 1500 об/мин (оборотов в минуту; 491×g) в течение 10 мин. Осадки ОИЛ можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды с 5% человеческой АВ сыворотки, 3000 МЕ/мл IL-2, и возвращать в исходные флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно во флаконах G-Rex 100, в день 7 ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию можно разделять на 3 100-мл аликвоты, которые можно использовать для засева 3 флаконов G-Rex 100. Затем в каждый флакон можно добавлять 150 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2. Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>, и через 4 дня 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. Клетки можно собирать в день 14 культивирования.

В одном из вариантов осуществления ОИЛ можно получать следующим образом. 2-мм<sup>3</sup> опухолевые фрагменты культивируют в полной среде (СМ), состоящей из среды AIM-V (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) с добавлением 2 мМ глутамина (Mediatech, Inc. Manassas, VA), 100 Ед/мл пенициллина (Invitrogen Life Technologies), 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen Life Technologies), 5% инактивированной нагреванием человеческой АВ сыворотки (Valley Biomedical, Inc. Winchester, VA) и 600 МЕ/мл rhIL-2 (Chiron, Emeryville, CA). Для ферментативного расщепления солидных опухолей образцы опухоли мелко нарезают в среде RPMI-1640, промывают и центрифугируют при 800 об/мин в течение 5 мин при 15-22°C, ресуспендируют в буфере для ферментативного расщепления (0,2 мг/мл коллагеназы и 30 единиц/мл ДНКазы в RPMI-1640), с последующим перемешиванием в течение ночи при комнатной температуре. ОИЛ, полученные из фрагментов, можно выращивать в течение 3-4 недель в СМ и размножить свежими, либо криоконсервировать в инактивированной нагреванием человеческой АВ сыворотке с добавлением 10% диметилсульфоксида (ДМСО) и хранить при -180°C до использования в исследовании. Опухоль-ассоциированные лимфоциты (ОАЛ), полученные из собранных асцитов, высевают при плотности 3×10<sup>6</sup> клеток/лунку в 24-луночный планшет в СМ. Рост ОИЛ контролируют примерно через день с использованием инвертированного микроскопа при малом увеличении.

В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры используют для размножения ОИЛ в присутствии МКПК с применением способов, композиций и устройств, известных в данной области, включая те, которые описаны в публикации патентной заявки США № 2005/0106717 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем, выбранный из группы, состоящей из примерно 100 мл, примерно 200 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 600 мл, примерно 700 мл, примерно 800 мл, примерно 900 мл, примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л, примерно 10 л, примерно 11 л, примерно 12 л, примерно 13 л, примерно 14 л, примерно 15 л, примерно 16 л, примерно 17 л, примерно 18 л, примерно 19 л, примерно 20 л, примерно 25 л и примерно 30 л. В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из объема от 50 до 150 мл, от 150 до 250 мл, от 250 до 350 мл, от 350 до 450 мл, от 450 до 550 мл, от 550 до 650 мл, от 650 до 750 мл, от 750 до 850 мл, от 850 до 950 мл и от 950 до 1050 мл. В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из объема от 1 л до 2 л, от 2 л до 3 л, от 3 л до 4 л, от 4 л до 5 л, от 5 л до 6 л, от 6 л до 7 л, от 7 л до 8 л, от 8 л до 9 л, от 9 л до 10 л, от 10 л до 11 л, от 11 л до 12 л, от 12 л до 13 л, от 13 л до 14 л, от 14 л до 15 л, от 15 л до 16 л, от 16 л до 17 л, от 17 л до 18 л, от 18 л до 19 л и от 19 л до 20 л. В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из объема от 0,5 л до 5 л, от 5 л до 10 л, от 10 л до 15 л, от 15 л до 20 л, от 20 л до 25 л и от 25 л до 30 л. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют время качания примерно 30 мин, примерно 1 ч, примерно 2 ч, примерно 3 ч, примерно 4 ч, примерно 5 ч, примерно 6 ч, примерно 7 ч, примерно 8 ч, примерно 9 ч, примерно 10 ч, примерно 11 ч, примерно 12 ч, примерно 24 ч, примерно 2 дня, примерно 3 дня, примерно 4 дня, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней, примерно 8 дней, примерно 9 дней, примерно 10 дней, примерно 11 дней, примерно 12 дней, примерно 13 дней, при-

мерно 14 дней, примерно 15 дней, примерно 16 дней, примерно 17 дней, примерно 18 дней, примерно 19 дней, примерно 20 дней, примерно 21 день, примерно 22 дня, примерно 23 дня, примерно 24 дня, примерно 25 дней, примерно 26 дней, примерно 27 дней и примерно 28 дней. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют время качания от 30 мин до 1 ч, от 1 ч до 12 ч, от 12 ч до 1 дня, от 1 дня до 7 дней, от 7 дней до 14 дней, от 14 дней до 21 дня и от 21 дня до 28 дней. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют скорость качания примерно 2 качания/минуту, примерно 5 качаний/мин, примерно 10 качаний/мин, примерно 20 качаний/мин, примерно 30 качаний/мин и примерно 40 качаний/мин. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют скорость качания от 2 качаний/мин до 5 качаний/мин, от 5 качаний/мин до 10 качаний/мин, от 10 качаний/мин до 20 качаний/мин, от 20 качаний/мин до 30 качаний/мин и от 30 качаний/мин до 40 качаний/мин. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют угол качания примерно 2°, примерно 3°, примерно 4°, примерно 5°, примерно 6°, примерно 7°, примерно 8°, примерно 9°, примерно 10°, примерно 11° и примерно 12°. В одном из вариантов осуществления для системы размножения клеток используют угол качания от 2° до 3°, от 3° до 4°, от 4° до 5°, от 5° до 6°, от 6° до 7°, от 7° до 8°, от 8° до 9°, от 9° до 10°, от 10° до 11° и от 11° до 12°.

В одном из вариантов осуществления способ размножения рОИЛ дополнительно включает этап, в котором отбирают рОИЛ на наличие превосходной реакционной способности в отношении опухоли. Можно использовать любой способ отбора, известный в данной области. Например, способы, описанные в публикации патентной заявки США № 2016/0010058 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, можно использовать для отбора ОИЛ на наличие превосходной реакционной способности в отношении опухоли.

Характеристики рОИЛ.

В одном из вариантов осуществления рОИЛ по изобретению имеют истощенный Т-клеточный фенотип, характеризующийся наличием одного или более Т-клеточных маркеров истощения. В одном из вариантов осуществления рОИЛ по изобретению имеют истощенный Т-клеточный фенотип, характеризующийся наличием одного или более Т-клеточных маркеров истощения, что определяют в проточнocyтoметрическом анализе. В одном из вариантов осуществления Т-клеточный маркер истощения представляет собой PD-1. В одном из вариантов осуществления Т-клеточный маркер истощения представляет собой LAG3. В одном из вариантов осуществления Т-клеточный маркер истощения представляет собой TIM3.

В одном из вариантов осуществления экспрессия PD-1 в рОИЛ уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140% или по меньшей мере 150% в сравнении с мОИЛ. В одном из вариантов осуществления экспрессия PD-1 в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз в сравнении с мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления экспрессия LAG3 в рОИЛ уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140%, или по меньшей мере 150% в сравнении с мОИЛ. В одном из вариантов осуществления экспрессия LAG3 в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз в сравнении с мОИЛ. В одном из вариантов осуществления экспрессия LAG3 в рОИЛ не поддается обнаружению методом проточной цитометрии.

В одном из вариантов осуществления экспрессия TIM3 в рОИЛ уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140% или по меньшей мере 150% в сравнении с мОИЛ. В одном из вариантов осуществления экспрессия TIM3 в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз или по меньшей мере в 10 раз в сравнении с мОИЛ. В одном из вариантов осуществления экспрессия TIM3 в рОИЛ не поддается обнаружению методом проточной цитометрии.

В одном из вариантов осуществления экспрессия TIGIT в рОИЛ уменьшена на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере





настоящем документе, могут включать этап размораживания криоконсервированных ОИЛ (например, криоконсервированных мОИЛ, криоконсервированных рОИЛ, либо их сочетания или смеси) перед проведением дополнительного этапа, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления дополнительный этап может представлять собой дополнительное или повторное размножение мОИЛ и/или рОИЛ (например, реПБР), который можно проводить на размороженных клетках, с использованием, например, среды для культивирования клеток с добавками, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и/или питающие клетки (например, антигенпредставляющие клетки), как правило, содержащей моноклеарные клетки периферической крови (МКПК; или, альтернативно, антигенпредставляющие клетки), при этом этап дополнительного размножения можно проводить в течение по меньшей мере 14 дней. В некоторых вариантах осуществления такая среда также может содержать сочетания ИЛ-2, ИЛ-15 и/или ИЛ-23, а не только один ИЛ-2.

Как описано в настоящем документе, криоконсервирование можно осуществлять во многие моменты времени в процессе размножения ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать популяцию суммарных ОИЛ (например, мОИЛ, рОИЛ, либо их сочетание или смесь) после размножения. Криоконсервирование, в целом, можно выполнять, помещая популяцию ОИЛ в раствор для замораживания, например, содержащий 85% АВ сыворотки с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 ч при  $-80^{\circ}\text{C}$ , необязательно, с переносом в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. См. Sadeghi et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, описанные в настоящем документе, можно криоконсервировать в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, описанные в настоящем документе, можно криоконсервировать в среде для культивирования клеток плюс 5% ДМСО.

По мере необходимости, криоконсервированные клетки, описанные в настоящем документе, такие как криоконсервированные рОИЛ, извлекают из морозильной камеры и размораживают в водяной бане с температурой  $37^{\circ}\text{C}$  до момента, когда примерно 4/5 раствора будет разморожено. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и, необязательно, промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ОИЛ можно подсчитывать и оценивать их жизнеспособность методом, известным в данной области.

Способы расщепления опухолей для получения рОИЛ В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли при помощи одного или более ферментов. Ферменты, подходящие для расщепления опухолей, описаны в публикации Volvitz et al., *BMC Neuroscience* 2016, 17, 30, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретение может включать способы получения рОИЛ, включающие этап, на котором опухоль, которая может представлять собой опухолевую ткань или ее часть, расщепляют с использованием дезоксирибонуклеазы, коллагеназы, гиалуронидазы или их сочетания.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, катализирующего гидролитическое расщепление фосфодиэфирных связей в каркасе ДНК, что приводит к деградации ДНК. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы (ДНКзы). В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы и по меньшей мере одного другого фермента. В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу I. В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу II. В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу I из бычьей поджелудочной железы (Sigma D5025 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой рекомбинантную бычью дезоксирибонуклеазу I, экспрессированную в *Pichia pastoris* (Sigma D2821 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой рекомбинантную человеческую дезоксирибонуклеазу I (rhДНКазу I, также известную как дорназа альфа, коммерчески доступную под названием пульмозим от компании Genentech, Inc.). В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу II из бычьей селезенки (Sigma D8764 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления дезоксирибонуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу II из свиной селезенки (Sigma D4138 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления любая из вышеуказанных дезоксирибонуклеаз присутствует в гидролизате опухоли. Получение и свойства дезоксирибонуклеаз, подходящих для использования по изобретению, описаны в патентах США №№ 5783433, 6391607, 7407785 и 7297526, и публикации международной патентной заявки № WO 2016/108244 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, катализирующего расщепление пептидных связей в коллагене, что приводит к деградации коллагена. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием коллагеназы. В одном из вариантов осуществления

способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием коллагеназы и по меньшей мере одного другого фермента. В одном из вариантов осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу из *Clostridium histolyticum*. В одном из вариантов осуществления коллагеназа представляет собой клостридиопептидазу А. В одном из вариантов осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу I. В одном из вариантов осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу II. В одном из вариантов осуществления коллагеназа представляет собой коллагеназу из *Clostridium histolyticum* (Sigma C5138 или эквивалент). Получение и свойства коллагеназ, подходящих для использования по изобретению, описаны в патентах США № 3201325, 3705083, 3821364, 5177017, 5422261, 5989888, 9211316, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, катализирующего деградацию гиалуроновой кислоты. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием гиалуронидазы. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием гиалуроноглюкозидазы. В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу I типа из бычьих семенников (Sigma H3506 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу II типа из овечьих семенников (Sigma H2126 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу III типа. В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу IV типа (IV-S типа) из бычьих семенников (Sigma H3884 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу V типа из овечьих семенников (Sigma H6254 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой гиалуронидазу VIII типа из бычьих семенников (Sigma H3757 или эквивалент). В одном из вариантов осуществления гиалуронидаза представляет собой рекомбинантную человеческую гиалуронидазу (коммерчески доступную под названием гиленекс от компании Halozyme, Inc.). Получение и свойства гиалуронидаз, подходящих для использования по изобретению, описаны в патентах США № 4820516, 5593877, 6057110, 6123938, 7767429, 8202517, 8431124 и 8431380, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы и гиалуронидазы. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы и коллагеназы. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием гиалуронидазы и коллагеназы. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы, гиалуронидазы и коллагеназы.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы и гиалуронидазы, а также по меньшей мере одного дополнительного фермента. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы и коллагеназы, а также по меньшей мере одного дополнительного фермента. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием гиалуронидазы и коллагеназы, а также по меньшей мере одного дополнительного фермента. В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием дезоксирибонуклеазы, гиалуронидазы и коллагеназы, а также по меньшей мере одного дополнительного фермента. В любом из вышеуказанных вариантов осуществления дополнительный фермент выбирают из группы, состоящей из казеиназы, клострипаина, трипсина, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, и дополнительно включает этап механического разрушения или фрагментирования опухоли до, в процессе или после расщепления.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 90 мин, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 5 ч, 6 ч, 7 ч, 8 ч, 9 ч, 10 ч, 11 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 36 ч и 48 ч.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из примерно 15 мин, примерно 30 мин, примерно 45 мин, примерно 1 ч, примерно 90 мин, примерно 2 ч, примерно 3 ч, примерно 4 ч, примерно 5 ч, примерно 6 ч, примерно 7 ч, примерно 8 ч, примерно 9 ч, примерно 10 ч, примерно 11 ч, примерно 12 ч, примерно 18 ч, примерно 24 ч, примерно 36 ч и примерно 48 ч.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из менее 15 мин, менее 30 мин, менее 45 мин, менее 1 ч, менее 90 мин, менее 2 ч, менее 3 ч, менее 4 ч, менее 5 ч, менее 6 ч, менее 7 ч, менее 8 ч, менее 9 ч, менее

10 ч, менее 11 ч, менее 12 ч, менее 18 ч, менее 24 ч, менее 36 ч и менее 48 ч.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из более 15 мин, более 30 мин, более 45 мин, более 1 ч, более 90 мин, более 2 ч, более 3 ч, более 4 ч, более 5 ч, более 6 ч, более 7 ч, более 8 ч, более 9 ч, более 10 ч, более 11 ч, более 12 ч, более 18 ч, более 24 ч, более 36 ч и более 48 ч.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят в течение периода времени, выбранного из группы, состоящей из периода времени от 30 мин до 1 ч, от 1 ч до 2 ч, от 2 ч до 3 ч, от 3 ч до 4 ч, от 4 ч до 5 ч, от 5 ч до 6 ч, от 6 ч до 12 ч, от 12 ч до 18 ч, от 18 ч до 24 ч и от 24 ч до 48 ч.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят при температуре, выбранной из группы, состоящей из примерно 20°C, примерно 25°C, примерно 30°C, примерно 35°C, примерно 40°C, примерно 45°C, примерно 50°C, примерно 55°C, примерно 60°C, примерно 65°C, примерно 70°C, примерно 75°C и примерно 80°C.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом расщепление проводят при температуре, выбранной из группы, состоящей из температуры от 20°C до 25°C, от 25°C до 30°C, от 30°C до 35°C, от 35°C до 40°C, от 40°C до 45°C, от 45°C до 50°C, от 50°C до примерно 55°C, от 55°C до 60°C, от 60°C до 65°C, от 65°C до 70°C, от 70°C до 75°C и от 75°C до 80°C.

В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом как период времени, так и температуру, расщепления уменьшают в случае расщепления остатков опухоли (после пре-ПБР). В одном из вариантов осуществления способ получения рОИЛ включает этап расщепления опухоли с использованием любого фермента, описанного выше, при этом как период времени, так и температуру, расщепления увеличивают в случае расщепления целых фрагментов опухоли (без пре-ПБР).

Способы модулирования соотношения рОИЛ и мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления концентрацию рОИЛ в сравнении с мОИЛ можно модулировать или контролировать за счет использования любых этапов размножения и расщепления, описанных в настоящем документе (включая пре-ПБР), так, что терапевтический препарат ОИЛ, предназначенный для использования в лечении видов рака, описанных в настоящем документе, может иметь нужное соотношение рОИЛ и мОИЛ. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу удаления мОИЛ из смеси мОИЛ и рОИЛ. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу удаления рОИЛ из смеси мОИЛ и рОИЛ.

В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению мОИЛ и/или рОИЛ можно добавлять в культуру до начального этапа размножения, на первом этапе размножения (например, пре-ПБР) и/или на втором этапе размножения (например, ПБР). В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению мОИЛ можно культивировать отдельно в соответствии с этапами культивирования или размножения, описанными в настоящем документе, используя один, два, три или более циклов размножения, и добавлять к популяции рОИЛ и мОИЛ при выбранном соотношении рОИЛ и мОИЛ. В некоторых вариантах осуществления способов по изобретению рОИЛ можно культивировать отдельно в соответствии с этапами культивирования или размножения, описанными в настоящем документе, используя один, два, три или более циклов размножения, и добавлять к популяции мОИЛ, получая смесь рОИЛ и мОИЛ с выбранным соотношением рОИЛ и мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления мОИЛ, полученные способами, описанными в настоящем документе, можно добавлять к популяции рОИЛ, добываясь выбранного соотношения рОИЛ и мОИЛ в полученной смеси рОИЛ/мОИЛ. В одном из вариантов осуществления рОИЛ, полученные способами, описанными в настоящем документе, можно добавлять к популяции мОИЛ, добываясь выбранного соотношения рОИЛ и мОИЛ в полученной смеси рОИЛ/мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака, включающему введение терапевтически эффективного количества ОИЛ пациенту, при этом соотношение рОИЛ и мОИЛ в ОИЛ (например, выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ) выбирают из группы, состоящей из примерно 0:100, примерно 1:99, примерно 5:95, примерно 10:90, примерно 15:85, примерно 20:80, примерно 25:75, примерно 30:70, примерно 35:65, примерно 40:60, примерно 45:55, примерно 50:50, примерно 55:45, примерно 60:40, примерно 65:35, примерно 70:30, примерно 75:25, примерно 80:20, примерно 85:15, примерно 90:10, примерно 95:5, примерно 99:1 и примерно 100:0 рОИЛ к мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ корректируют с использованием метода селекции, который может быть использован для увеличения или уменьшения количества рОИЛ относительно мОИЛ, как известно квалифицированному специалисту. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на отсутствии маркеров истощения, включая TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1 и CTLA-4. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на повышенной экспрессии

CD69. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на более высокой митохондриальной массе. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на подгруппе белков клеточной поверхности. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на фенотипе. В одном из вариантов осуществления метод селекции основан на функции.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ корректируют путем совместного культивирования рОИЛ и мОИЛ в одной и той же среде для культивирования клеток до достижения желательного соотношения. В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ корректируют путем совместного культивирования рОИЛ и мОИЛ в одной и той же среде для культивирования клеток, включая добавление рОИЛ или мОИЛ в среду для культивирования клеток в разные моменты времени в процессе размножения, до достижения желательного соотношения. В одном из вариантов осуществления рост рОИЛ предпочтительно стимулируют в среде для культивирования клеток путем добавления цитокинов, отличных от IL-2, в том числе IL-4, IL-7, IL-15 и/или IL-21.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ (например, выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ), получаемое способами, описанными в настоящем документе, может составлять по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% рОИЛ относительно мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ (например, выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ), получаемое способами, описанными в настоящем документе, может составлять не более 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% рОИЛ относительно мОИЛ.

В одном из вариантов осуществления соотношение рОИЛ и мОИЛ (например, выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ), получаемое способами, описанными в настоящем документе, может составлять примерно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 99,9% рОИЛ относительно мОИЛ.

Способы лечения рака и других заболеваний.

рОИЛ, а также сочетания рОИЛ и мОИЛ, описанные в настоящем документе, могут быть использованы в способе лечения заболеваний у человека. В одном из вариантов осуществления они предназначены для использования в лечении гиперпролиферативного заболевания. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой солидную раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидную раковую опухоль выбирают из группы, состоящей из меланомы, дважды рефрактерной меланомы (то есть, меланомы, рефрактерной к по меньшей мере двум предшествующим методам лечения, включая химиотерапию и блокаду иммунных контрольных точек), рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом папилломы человека, рака головы и шеи, рака почки, почечноклеточного рака и саркомы. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой гематологическое злокачественное новообразование (или жидкую раковую опухоль). В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из острого миелоидного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфома Ходжкина, фолликулярной лимфомы и лимфомы из клеток мантийной зоны. рОИЛ и сочетания рОИЛ и мОИЛ, описанные в настоящем документе, также могут быть использованы в лечении других заболеваний, описанных в настоящем документе в следующих далее параграфах.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом рОИЛ получены способом, включающим следующие этапы:

- (a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);
- (b) фрагментирование ткани опухоли;
- (c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования

клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одно-

временно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, дважды рефрактерной меланомы, рака яичника, рака шейки матки, рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака головы и шеи, почечноклеточного рака, острого миелоидного лейкоза, колоректального рака, саркомы, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и трижды негативного рака молочной железы.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему следующие этапы:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту, при этом режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение пяти дней;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в настоящем документе, этап удаления

по меньшей мере множества мОИЛ включает удаление по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% или 100% мОИЛ.

Эффективность соединений и сочетаний соединений, описанных в настоящем документе, для лечения, предотвращения и/или контроля указанных заболеваний или нарушений можно тестировать с использованием различных моделей, известных в данной области, которые позволяют разработать руководство по лечению заболевания человека. Например, модели для определения эффективности методов лечения рака яичника описаны, например, в Mullany et al., *Endocrinology* 2012, 153, 1585-92; и Fong et al., *J. Ovarian Res.* 2009, 2, 12. Модели для определения эффективности методов лечения рака поджелудочной железы описаны в Herregos-Villanueva et al., *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Модели для определения эффективности методов лечения рака молочной железы описаны, например, в Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Модели для определения эффективности методов лечения меланомы описаны, например, в Damsky et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853-859. Модели для определения эффективности методов лечения рака легкого описаны, например, в Meuwissen et al., *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Модели для определения эффективности методов лечения рака легкого описаны, например, в Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60; и Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

Совместное введение ИЛ-2.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему следующие этапы:

(a) получение рОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, способом, описанным в настоящем документе;

(b) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(c) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту; и

(d) лечение пациента с применением режима введения ИЛ-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту.

В одном из вариантов осуществления режим введения ИЛ-2 представляет собой режим высоких доз ИЛ-2, при этом режим высоких доз ИЛ-2 включает внутривенное введение альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, начиная на следующий день после введения терапевтически эффективного количества третьей популяции ОИЛ, при этом альдеслейкин, либо его биологический аналог или вариант, вводят в дозе 600000 или 720000 МЕ/кг (массы тела пациента) в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности, максимально 14 доз. После 9 дней отдыха эту схему введения можно повторять для следующих 14 доз, всего максимально 28 доз.

В одном из вариантов осуществления режим введения ИЛ-2 представляет собой режим высоких доз ИЛ-2, при этом режим высоких доз ИЛ-2 включает внутривенное введение альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, начиная на следующий день после введения терапевтически эффективного количества третьей популяции ОИЛ, при этом альдеслейкин, либо его биологический аналог или вариант, вводят в дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг (массы тела пациента) в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности, максимально 14 доз. После 9 дней отдыха эту схему введения можно повторять для следующих 14 доз, всего максимально 28 доз.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (ИЛ-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и ИЛ-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и



при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом режим высоких доз IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 представляет собой "декрешендо" режим введения IL-2. "Декрешендо" режимы введения IL-2 описаны в публикациях 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 "декрешендо" режим введения IL-2 включает введение  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 6 ч, с последующим введением  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 12 ч, с последующим введением  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 24 ч, с последующим введением  $4,5 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 72 ч. Этот цикл лечения можно повторять каждые 28 дней, используя максимально четыре цикла. В одном из вариантов осуществления "декрешендо" режим введения IL-2 включает введение 18000000 МЕ/м<sup>2</sup> в день 1, 9000000 МЕ/м<sup>2</sup> в день 2 и 4500000 МЕ/м<sup>2</sup> в дни 3 и 4.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением "декрешендо" режима введения IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом "декрешендо" режим введения IL-2 включает введение  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 6 ч, с последующим введением  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 12 ч, с последующим введением  $18 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 24 ч, с последующим введением  $4,5 \times 10^6$  МЕ/м<sup>2</sup> внутривенно в течение 72 ч, с повторением цикла каждые 28 дней и использованием максимально четырех циклов.

В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 включает введение пегилированного IL-2, в том числе, пегилированного альдеслейкина. В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 включает введение пегилированного IL-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 дней в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака у пациента, который нуждается в таком лечении, включающему:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли;

(c) обработку ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования

клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением остатков опухоли и мигрирующих ОИЛ (мОИЛ);

(d) удаление по меньшей мере множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси;

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных ремнантных опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ),

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ,

при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, а также их сочетания, и

при этом вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетания,

(g) лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения рОИЛ пациенту;

(h) введение терапевтически эффективного количества рОИЛ пациенту, при этом пациенту одновременно вводят терапевтически эффективное количество мОИЛ в смеси с рОИЛ; и

(i) лечение пациента с применением режима введения пегилированного IL-2, начиная на следующий день после введения рОИЛ пациенту,

при этом режим введения пегилированного IL-2 включает введение пегилированного IL-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 дней в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

Немиелоаблативная лимфодеплеция с химиотерапией.

В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака популяцией рОИЛ, при этом пациент получает предварительное лечение немиелоаблативной химиотерапией до инфузии рОИЛ по изобретению. В некоторых вариантах осуществления популяция рОИЛ может быть предоставлена с популяцией мОИЛ, при этом пациент получает предварительное лечение немиелоаблативной химиотерапией до инфузии рОИЛ и мОИЛ по изобретению. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой введение циклофосфида в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дней 27 и 26 перед инфузией рОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение 5 дней (дней 27-23 перед инфузией рОИЛ). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии рОИЛ (в день 0), в соответствии с настоящим изобретением, пациент получает внутривенную инфузию IL-2 в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 ч до физиологической толерантности.

Экспериментальные результаты показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет элиминации регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы ("поглотителей цитокинов"). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемой "иммуносупрессивным кондиционированием") для пациента перед введением рОИЛ по изобретению.

Как правило, лимфодеплецию осуществляют путем введения флударабина или циклофосфида (активную форму называют мафосфамидом) и их сочетаний. Такие способы описаны в 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.

В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят 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 дозе 10 мг/кг/сутки, 15 мг/кг/сутки, 20 мг/кг/сутки, 25 мг/кг/сутки, 30 мг/кг/сутки, 35 мг/кг/сутки, 40 мг/кг/сутки или 45 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активная форма циклофосфида, достигает концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл при введении циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активная форма циклофосфида, достигает концентрации 1 мкг/мл при введении циклофосфида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят 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 дозе 100 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 150 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 175 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 200 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 225 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 250 мг/м<sup>2</sup>/сутки, 275 мг/м<sup>2</sup>/сутки или 300 мг/м<sup>2</sup>/сутки. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (в/в). В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в те-

чение 4-5 дней в дозе 250 мг/м<sup>2</sup>/сутки в/в. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 4 дней в дозе 250 мг/м<sup>2</sup>/сутки в/в.

В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецию осуществляют путем совместного введения пациенту флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в/в и циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м<sup>2</sup>/сутки в/в в течение 4 дней.

В одном из вариантов осуществления лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м<sup>2</sup>/сутки в течение пяти дней.

Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования.

В одном из вариантов осуществления рОИЛ, размноженные с использованием способов по изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию рОИЛ в стерильном буфере. рОИЛ, размноженные с использованием способов по изобретению, можно вводить любым подходящим путем введения, известным в данной области. Предпочтительно, рОИЛ вводят одной внутриартериальной или внутривенной инфузией, которая, предпочтительно, продолжается примерно 30-60 мин. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический пути введения.

В одном из вариантов осуществления рОИЛ и мОИЛ, размноженные с использованием способов по изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию рОИЛ и мОИЛ в стерильном буфере. рОИЛ и мОИЛ, размноженные с использованием способов по изобретению, можно вводить любым подходящим путем введения, известным в данной области. Предпочтительно, рОИЛ и мОИЛ вводят одной внутриартериальной или внутривенной инфузией, которая, предпочтительно, продолжается примерно 30-60 мин. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический пути введения.

Можно вводить любую подходящую дозу рОИЛ. Предпочтительно, вводят от примерно  $2,3 \times 10^{10}$  до примерно  $13,7 \times 10^{10}$  рОИЛ, в среднем примерно  $7,8 \times 10^{10}$  рОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от примерно  $1,2 \times 10^{10}$  до примерно  $4,3 \times 10^{10}$  рОИЛ.

Можно вводить любую подходящую дозу рОИЛ и мОИЛ. Предпочтительно, вводят от примерно  $2,3 \times 10^{10}$  до примерно  $13,7 \times 10^{10}$  рОИЛ и мОИЛ, в среднем примерно  $7,8 \times 10^{10}$  рОИЛ и мОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от примерно  $1,2 \times 10^{10}$  до примерно  $4,3 \times 10^{10}$  рОИЛ и мОИЛ.

В некоторых вариантах осуществления число рОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению составляет примерно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  и  $9 \times 10^{13}$ . В одном из вариантов осуществления число рОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению находится в диапазоне от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$ , от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^7$  до  $5 \times 10^7$ , от  $5 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$ , от  $1 \times 10^8$  до  $5 \times 10^8$ , от  $5 \times 10^8$  до  $1 \times 10^9$ , от  $1 \times 10^9$  до  $5 \times 10^9$ , от  $5 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$ , от  $1 \times 10^{10}$  до  $5 \times 10^{10}$ , от  $5 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{11}$ , от  $5 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^{12}$ , от  $1 \times 10^{12}$  до  $5 \times 10^{12}$  и от  $5 \times 10^{12}$  до  $1 \times 10^{13}$ .

В некоторых вариантах осуществления число рОИЛ и мОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению составляет примерно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  и  $9 \times 10^{13}$ . В одном из вариантов осуществления число рОИЛ и мОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению находится в диапазоне от  $1 \times 10^6$  до  $5 \times 10^6$ , от  $5 \times 10^6$  до  $1 \times 10^7$ , от  $1 \times 10^7$  до  $5 \times 10^7$ , от  $5 \times 10^7$  до  $1 \times 10^8$ , от  $1 \times 10^8$  до  $5 \times 10^8$ , от  $5 \times 10^8$  до  $1 \times 10^9$ , от  $1 \times 10^9$  до  $5 \times 10^9$ , от  $5 \times 10^9$  до  $1 \times 10^{10}$ , от  $1 \times 10^{10}$  до  $5 \times 10^{10}$ , от  $5 \times 10^{10}$  до  $1 \times 10^{11}$ , от  $5 \times 10^{11}$  до  $1 \times 10^{12}$ , от  $1 \times 10^{12}$  до  $5 \times 10^{12}$  и от  $5 \times 10^{12}$  до  $1 \times 10^{13}$ .

В некоторых вариантах осуществления концентрация рОИЛ в фармацевтических композициях по 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 от фармацевтической композиции.



В некоторых вариантах осуществления количество рОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению равно, или меньше чем, 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.

В некоторых вариантах осуществления количество рОИЛ и мОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению равно, или меньше чем, 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.

В некоторых вариантах осуществления количество рОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению превышает 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 г, 3 г, 3,5 г, 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.

В некоторых вариантах осуществления количество рОИЛ и мОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению превышает 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 г, 3 г, 3,5 г, 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.

рОИЛ в фармацевтических композициях по вариантам осуществления изобретения эффективны в широком диапазоне доз. Точная доза будет зависеть от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, получающего лечение, массы тела субъекта, получающего лечение, а также от предпочтений и опыта лечащего врача. Принятые в клинической практике дозы рОИЛ также можно использовать, при необходимости.

Количества фармацевтических композиций, вводимых в способах, описанных в настоящем документе, например, дозы рОИЛ, будут зависеть от человека или млекопитающего, получающего лечение, степени тяжести заболевания или состояния, пути введения, характера активных фармацевтических ингредиентов и решения лечащего врача.

рОИЛ и мОИЛ в фармацевтических композициях по вариантам осуществления изобретения эффективны в широком диапазоне доз. Точная доза будет зависеть от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, получающего лечение, массы тела субъекта, получающего лечение, а также от предпочтений и опыта лечащего врача. Принятые в клинической практике дозы рОИЛ и мОИЛ также можно использовать, при необходимости. Количества фармацевтических композиций, вводимых в способах, описанных в настоящем документе, например, дозы рОИЛ и мОИЛ, будут зависеть от человека или млекопитающего, получающего лечение, степени тяжести заболевания или состояния, пути введения, характера активных фармацевтических ингредиентов и решения лечащего врача.

В некоторых вариантах осуществления рОИЛ можно вводить в одной дозе. Такое введение можно выполнять путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления рОИЛ можно вводить в нескольких дозах. Дозирование можно выполнять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Дозирование можно выполнять один раз в месяц, один раз каждые две недели, один раз в неделю или через день. Введение рОИЛ можно продолжать до тех пор, пока это необходимо.

В некоторых вариантах осуществления рОИЛ и мОИЛ можно вводить в одной дозе. Такое введение можно выполнять путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления рОИЛ и мОИЛ можно вводить в нескольких дозах. Дозирование можно выполнять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Дозирование можно выполнять один раз в месяц, один раз каждые две недели, один раз в неделю или через день. Введение рОИЛ и мОИЛ можно продолжать до тех пор, пока это необходимо.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза рОИЛ составляет примерно  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$ ,  $7 \times 10^6$ ,  $8 \times 10^6$ ,  $9 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $6 \times 10^7$ ,  $7 \times 10^7$ ,  $8 \times 10^7$ ,  $9 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$  и  $9 \times 10^{13}$ . В некоторых



примерно 207 мг.

Эффективное количество рОИЛ и/или мОИЛ можно вводить либо в одной, либо в нескольких дозах любым из принятых путей введения средств, имеющих аналогичные свойства, в том числе инфузией в кровотоки, инфузией в опухоль, внутриартериальной инъекцией, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, топически, интраназальным путем введения, путем трансплантации или ингаляцией.

### Примеры

Далее варианты осуществления настоящего изобретения описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры приведены исключительно с целью иллюстрации, и изобретение, описанное в настоящем документе, никоим образом не должно считаться ограниченным данными примерами, а скорее, должно считаться охватывающим любые, и все, вариации, которые станут очевидными на основании идей, изложенных в настоящем документе.

Пример 1. Размножение рОИЛ из гидролизатов опухолей.

Остатки опухоли расщепляли в соответствии со следующей иллюстративной процедурой.

Данная процедура описывает расщепление свежего образца человеческой опухоли до суспензии одиночных жизнеспособных клеток с целью получения и выделения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов, и можно использовать методы с применением смеси ДНКазы-коллагеназы-гиалуронидазы (ДКГ) (как описано в настоящем документе) или протоколы расщепления с применением набора MACS для диссоциации человеческих опухолей (TDC) (Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA).

Приготовление рабочей культуральной среды CM1+IL-2 проводят следующим образом. Помещают 500 мл RPMI 1640, 200 мМ L-глутамин и 100 мл человеческой АВ сыворотки в водяную баню с температурой 37°C и уравнивают в течение по меньшей мере 30 мин. Переносят данную смесь из водяной бани в бокс биологической безопасности, туда же переносят из холодильника 1000× маточный раствор β-МЕ и маточный раствор гентамицина с концентрацией 50 мг/мл. Отбирают 50 мл из среды RPMI 1640, добавляют: 50 мл человеческой АВ сыворотки, 5 мл 200 мМ L-глутамин, 500 мкл 1000X β-МЕ и 500 мкл 50 мг/мл гентамицина. Завершают приготовление среды 1 добавлением 500 мкл 6000 Ед/мл восстановленного человеческого rhIL-2 (CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA).

10× маточный раствор ДКГ готовят с использованием следующей процедуры, схематически представленной на фиг. 1. Сначала рассчитывают объем, необходимый для разведения каждого фермента до нужной рабочей концентрации раствора. Например, разводят 150000 Ед (международных единиц) дезоксирибонуклеазы в 15 мл для получения рабочего раствора с концентрацией 10000 Ед/мл. Полученный рабочий раствор разделяют на аликвоты. Разводят лиофилизированные ферменты в предварительно рассчитанном количестве стерильного сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS, Sigma H6648, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA, или эквивалент) при комнатной температуре. Собирают любой остаточный порошок со стенок флаконов и с защитной фольги. Перемешивают пипетированием вверх-вниз несколько раз и взбалтывают для гарантии полного растворения. В стерильный HBSS добавляют 100000 Ед ДНКзы (дезоксирибонуклеазы I из бычьей поджелудочной железы, Sigma D5025 или эквивалент), 1 г коллагеназы (Sigma C5138 из Clostridium histolyticum или эквивалент) и 100 мг гиалуронидазы (V типа из овечьих семенников, Sigma H6254 или эквивалент) до конечного объема 100 мл, получая 10× трехферментный маточный раствор для расщепления человеческих опухолей. Полученные рабочие растворы ферментов разделяют на аликвоты, содержащие 10000 Ед/мл ДНКзы, 10 мг/мл коллагеназы и 1 мг/мл гиалуронидазы. 10× маточный раствор ДКГ в конечном объеме 100 мл имеет следующие концентрации: ДНКза I 1000 Ед/мл, коллагеназа 10 мг/мл и гиалуронидаза 1 мг/мл. Для расщепления опухоли 10× маточный раствор ДКГ разбавляют до 1× ДКГ в HBSS.

Параллельно, для сравнения расщепления при помощи ДКГ с расщеплением при помощи MACS TDC, готовят реагенты, включенные в набор MACS TDC, в соответствии с инструкциями производителя, при необходимости. Аликвоты, которые хранили при -20°C, размораживают при комнатной температуре.

Опухоль для расщепления можно готовить следующим образом. Извлекают опухоль из ее первичной и вторичной упаковки, взвешивают емкость, записывают массу и переносят в бокс биологической безопасности. Разрезают опухоль на фрагменты, или проводят морцелляцию опухоли. Выбирают несколько фрагментов для использования в протоколе расщепления, и дополнительные фрагменты сохраняют для гистологических исследований и экстрагирования ДНК, при необходимости.

Иллюстративная процедура расщепления опухоли с использованием ДКГ схематически представлена на фиг. 2 и включает следующие этапы. 10× маточный раствор ДКГ следует развести до 1× рабочей концентрации для расщепления. Рассчитывают общий объем, необходимый для расщепления опухоли, который составляет примерно 5 мл раствора на см<sup>2</sup> опухоли. Разводят раствор ДКГ до 1× рабочего раствора путем добавления 1 части ДКГ к 9 частям HBSS. Переносят фрагменты опухоли в 50-мл коническую пробирку Falcon в объеме HBSS, рассчитанном, как описано выше. Добавляют рассчитанное количество 10× ДКГ, закрывают пробирку крышкой и, необязательно, герметизируют. Переносят во вращательную пробирку MACS (Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) в инкубаторе с 37°C и увлажненной

атмосферой с 5% CO<sub>2</sub> для постоянного вращения в течение 1-2 ч. Альтернативно, фрагменты опухоли можно расщеплять при комнатной температуре в течение ночи, также при постоянном вращении. Присоединяют 0,70-мкм сетчатый фильтр к стерильной конической пробирке Falcon. Извлекают гидролизат опухоли из инкубатора и при помощи пипетки переносят весь гидролизат в фильтр. Используют торец поршня стерильного шприца для проталкивания любых твердых фрагментов через фильтр. Пробирку закрывают, она содержит полученные при расщеплении ДКГ рОИЛ. Клетки можно промывать для удаления расщепляющего коктейля, подсчитывать и ресуспендировать в среде для ПБР размножения, как описано в другом разделе настоящего документа.

Если желателен этап пре-ПБР с целью получения мОИЛ для сравнения с рОИЛ (как в следующих далее примерах), засевают флаконы G-REX для пре-ПБР с использованием полученных при расщеплении ДКГ рОИЛ. Маркируют нужное количество флаконов G-REX 10 и добавляют гидролизат. Добавляют CM1+IL-2 до достижения конечного объема 40 мл. Помещают флаконы в инкубатор с 5% CO<sub>2</sub> в увлажненной атмосфере при 37°C. Подсчет и определение жизнеспособности клеток можно выполнять на приборе Nexcelom Cellometer K2 с использованием 40 мкл образца и 40 мкл раствора красителей акридинового оранжевого и пропидия иодида для двойного окрашивания (АОПИ), и производить подсчет в двойном повторе для каждого гидролизата или условия, разбавляя по мере необходимости. Образцы следует тщательно смешивать во избежание комкования, и быстро добавлять пипеткой АОПИ перед анализом каждого образца для гарантии того, что на результаты определения жизнеспособности не повлияет цитотоксический эффект пропидия иодида.

Процедура с применением ДКГ, описанная выше, как установлено, неожиданно превосходит по эффективности ферментную расщепляющую смесь MACS TDK и соответствующую процедуру по нескольким причинам. Проводили три независимых эксперимента с использованием смеси MACS TDK. Первый эксперимент проводили с использованием опухоли меланомы, при этом наблюдали значительное снижение популяции CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> клеток в рОИЛ методом проточной цитометрии в случае использования системы MACS. Такой эффект не наблюдали для рОИЛ при расщеплении ДКГ, это свидетельствовало о том, что расщепляющая процедура MACS может отрицательно влиять на экспрессию поверхностных маркеров. Во втором эксперименте использовали положительную по эстрогеновому рецептору (ЭР<sup>+</sup>)/положительную по прогестероновому рецептору (ПР<sup>+</sup>) опухоль молочной железы, и расщепление при помощи MACS приводило к появлению детрита в 24-луночном планшете G-REX, в то время как расщепление при помощи ДКГ приводило к получению прозрачного материала, это указывало на плохое расщепление ферментным коктейлем MACS. И наконец, второе расщепление другой ЭР<sup>+</sup>/ПР<sup>+</sup> опухоли молочной железы с использованием ферментной расщепляющей смеси и процедуры MACS TDK приводило к плохому выходу и плохой жизнеспособности рОИЛ.

Пример 2. Характеризация фенотипа рОИЛ из гидролизатов опухолей.

На этапе пре-ПБР резидентные ОИЛ мигрируют в виде мОИЛ и пролиферируют. Продолжительность пре-ПБР, используемого для получения мОИЛ с целью сравнения с рОИЛ, может варьироваться в пределах 11-21 дней в зависимости от роста клеток. Остаточные фрагменты опухоли (остатки) обычно отбрасывают, и размноженные мОИЛ подвергают ПБР с облученными МКПК в качестве питающих клеток, анти-CD3 и IL-2. Жизнеспособные ОИЛ, остающиеся в остатках опухоли (рОИЛ) после пре-ПБР, исследовали после расщепления, описанного в примере 1, приведенном выше, для оценки их функции и фенотипа в сравнении с мОИЛ.

Популяции клеток из остатков опухоли и пре-ПБР суспензии (то есть, размноженной популяции клеток) для опухолей меланомы, головы и шеи, молочной железы, почки, поджелудочной железы, легкого и колоректального рака (n=17) оценивали и сравнивали. Интересно, что рОИЛ неизменно фенотипически отличаются от мОИЛ, что определено в настоящей работе и продемонстрировано на основании дифференциальной экспрессии различных маркеров, включая LAG3, TIM-3, PD-1, CD69, CD45RO, CD27, CD56, CD57 и HLA-DR. ПБР остатков опухоли и пре-ПБР популяций приводил к сопоставимым показателям размножения, однако, аналогично результатам на этапе пре-ПБР, фенотипические профили отличались у двух популяций в отношении LAG3, TIM-3, HLA-DR и CD28.

рОИЛ и мОИЛ, полученные из опухолей меланомы, молочной железы, почки, поджелудочной железы, легкого и колоректального рака (n=9), оценивали и сравнивали. Опухолевые рОИЛ неизменно фенотипически отличаются от мОИЛ, что определено на основании дифференциальной экспрессии различных маркеров (табл. 3 и фиг. 3).



Таблица 3. Сводные результаты характеристики фенотипа для девяти опухолей

Экспрессия маркера	LAG3 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) СИФ	TIM3 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) СИФ	PD-1 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) %	CD69 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) СИФ	CD154 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) СИФ	CD28 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) СИФ	CD57 (CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> ) %	CD56 %
МОИЛ	507/ 144	2832/ 1756	36,95/ 47	1320/ 1543	1498/ 3751	1163/ 5036	18,76/ 19,6	5,615
РОИЛ	209/ 106	877/ 742	42,8/ 48	3437/ 223,4	1034/ 1167	458,3/ 2795	9,16/ 8,5	1,027
*Р-значения (CD8/ CD4)	0,05/ 0,21	0,05/ 0,01	0,38/ 0,89	0,11/ 0,001	0,55/ 0,01	0,05/ 0,11	0,05/ 0,06	0,05

\*Р-значения относятся к различиям между рОИЛ и мОИЛ при использовании непарного t-критерия Стьюдента.

Фундаментальными отличиями рОИЛ в сравнении с мОИЛ являлись: повышенная экспрессия CD69 (7-кратное отличие средней интенсивности флуоресценции (СИФ) в CD4<sup>+</sup>) ( $p < 0,0001$ ), сниженная экспрессия LAG3 (2-кратное отличие СИФ в CD8<sup>+</sup> Т-клетках) ( $p < 0,05$ ) и экспрессия TIM3 (3- и 2-кратное отличие СИФ в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках, соответственно) ( $p < 0,05/0,01$ ), сниженная экспрессия CD154 (3-кратное отличие СИФ в CD4<sup>+</sup> Т-клетках) ( $p < 0,01$ ) и сниженная экспрессия CD56 (5%) ( $p < 0,05$ ). Удивительно, но ПБР рОИЛ и мОИЛ приводил к сопоставимым показателям размножения, аналогично результатам пре-ПБР, как описано в примере 4. Фенотипический профиль рОИЛ сохранялся после ПБР, с поддержанием индивидуальных уровней экспрессии LAG3, TIM3 и CD28, как описано в примере 4. Более того, поскольку CD57 является рецептором, связанным с терминальной дифференциацией, результаты свидетельствуют о том, что рОИЛ являются менее терминально дифференцированными, чем мОИЛ (то есть, с меньшей вероятностью гибели).

Результаты, представленные на фиг. 3 и в табл. 3, показывают, что мОИЛ и рОИЛ имеют четкие и устойчивые различия экспрессии фенотипических маркеров в гистологически отличающихся опухолях. Особо следует отметить, что имело место уменьшение экспрессии так называемых "маркеров истощения" (LAG3 и TIM3) в рОИЛ. Интересно, что экспрессия PD-1 была аналогичной в мОИЛ и рОИЛ. Кроме того, имело место увеличение экспрессии CD69 в рОИЛ, в сравнении с мОИЛ, хотя экспрессия KLRG1 была аналогичной в этих двух популяциях (данные не представлены). Эти результаты являются дополнительным свидетельством в пользу того, что рОИЛ, судя по всему, не являются терминально дифференцированными, но фенотипически сходными с резидентными в тканях эффекторными Т-клетками памяти.

В совокупности, данные результаты позволили выявить значительные различия в биологии клеточных популяций, которые остаются в опухоли или размножаются и мигрируют из опухоли, а также сигналы, связанные с миграцией и ретенцией.

Пример 3. Функциональная характеристика рОИЛ из гидролизатов опухолей.

Т-клеточная дисфункция напрямую связана с потерей митохондриальной функции. Sharping et al., Immunity 2016, 45, 374-88. Кроме того, перепрограммирование Т-клеток для стимуляции митохондриального биогенеза может приводить к усилению персистенции и функции Т-клеток внутри опухоли. Таким образом, Т-клетки с более активным метаболизмом имеют решающее значение для развития эффективного иммунного ответа на опухоль. С целью оценки функциональности мОИЛ и рОИЛ проводили сравнение мОИЛ и рОИЛ в отношении метаболической емкости при помощи Mitotracker и 2-(N-(7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол-4-ил)амино)-2-дезоксиглюкозы (2-NBDG). 2-NBDG можно использовать для измерения поглощения глюкозы, однако при этом невозможно точно определить основной метаболический процесс; то есть, полное окисление в митохондриях, или только гликолиз и образование лактата. Краситель Mitotracker (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) можно использовать для измерения митохондриальной массы. Сравнение мОИЛ и рОИЛ с помощью данного подхода продемонстрировало увеличение поглощения глюкозы в рОИЛ, как показано на фиг. 4. Этот результат является неожиданным, поскольку ожидается, что рОИЛ, непосредственно высвобождающиеся из опухоли, будут более гликолитическими; однако, когда была произведена оценка митохондриальной массы рОИЛ, у них был отмечен слегка повышенный уровень Mitotracker в сравнении с мОИЛ. Эти результаты указывают на то, что рОИЛ были более метаболически активными, чем мОИЛ, хотя ожидалось, что они будут менее активными, и свидетельствуют о том, что рОИЛ могут обладать большей способностью осуществлять иммунный ответ на опухоль, чем мОИЛ.

Для дальнейшей оценки их функциональной способности рОИЛ стимулировали в течение ночи брэфелдином А и гранулами, покрытыми анти-CD3, анти-CD28 и анти-CD137 антителами (DYNABEADS, каталожный № 11162D, коммерчески доступны от компании ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), и измеряли уровень IFN- $\gamma$ . Клетки собирали, окрашивали на внутриклеточный IFN- $\gamma$  после пермеа-

билизации и оценивали методом проточной цитометрии. Результаты представлены на фиг. 5.

Клетки также стимулировали форбол-12-миристат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином для оценки способности ОИЛ продуцировать цитокин. Результаты также представлены на фиг. 5. Также оценивали уровни гранзима В, TNF- $\alpha$  и IL-17A. Между рОИЛ и мОИЛ имела место незначительная разница в отношении IL-17A, и отсутствовали различия в отношении TNF $\alpha$  или гранзима В (данные не представлены). Удивительно, что в условиях стимуляции анти-CD3/анти-CD28/анти-CD137 гранулами и ФМА/иономицином наблюдали слегка повышенный уровень IFN- $\gamma$  в подгруппе CD4<sup>+</sup> клеток (но не в CD8<sup>+</sup> Т-клетках) (n=3) в рОИЛ в сравнении с мОИЛ. Эти данные свидетельствуют о том, что рОИЛ являются функционально компетентными клетками и демонстрируют признаки большей функциональной компетентности, чем мОИЛ.

Пример 4. Сравнение ПБР для рОИЛ и мОИЛ из гидролизатов опухолей.

Для мОИЛ и рОИЛ выполняли протокол быстрого размножения (ПБР) с облученными МКПК в качестве питающих клеток, анти-CD3 антителом (ОКТ3) и IL-2 в течение 14 дней. Жизнеспособность и количество клеток оценивали в двойном повторе для 3 независимых опухолей (n=3). Фенотипическую экспрессию оценивали методом проточной цитометрии. Успешную инициацию в мини-ПБР экспериментах наблюдали как для рОИЛ, так и для мОИЛ. В ПБР результаты размножения ОИЛ с анти-CD3 антителом и питающими клетками были аналогичными (фиг. 6А), хотя в случае рОИЛ, неожиданно, количество клеток было слегка повышено (p<0,08), в сравнении с мОИЛ. Аналогично наблюдениям до ПБР (смотри пример 2), мОИЛ и рОИЛ, полученные после ПБР, фенотипически отличались. Многие из фенотипических отличий, наблюдаемых в фазе пре-ПБР, сохранялись в процессе ПБР, например, уменьшение экспрессии LAG3 и TIM3 в рОИЛ (фиг. 6В).

Дополнительные свойства мОИЛ и рОИЛ можно сравнивать на основании результатов (1) глубокого секвенирования TCR, (2) пролиферации при совместном культивировании (совместное культивирование рОИЛ/мОИЛ со смесями цитокинов) и дополнительных функциональных анализов, (3) анализов для транскрипционного профилирования (например, с использованием системы NCOUNTER от компании NanoString Technologies). Секвенирование TCR позволяет оценивать клональность и/или разнообразие репертуара TCR, включая репертуар V $\beta$ . Для сравнения рОИЛ с мОИЛ также можно оценивать длину теломера.

Пример 5. Лечение болезней человека при помощи рОИЛ и сочетаний рОИЛ и мОИЛ.

рОИЛ по изобретению могут быть использованы в лечении видов рака, описанных в настоящем документе. Общая схема технологического процесса для размножения рОИЛ из опухоли пациента и лечения пациента представлена на фиг. 7. Как показано, данный процесс позволяет индивидуально корректировать соотношение рОИЛ и мОИЛ в препарате ОИЛ, вводимом инфузией пациенту. Соотношение рОИЛ и мОИЛ можно выбирать с помощью анализа аффинности или другого анализа с сортировкой клеток, известного специалистам в данной области, на основании дифференциальной экспрессии CD69 и/или Т-клеточных маркеров истощения в рОИЛ и мОИЛ.

На фиг. 8 временной график иллюстративного процесса получения рОИЛ из опухоли пациента, размножения рОИЛ из остатков опухоли после пре-ПБР с использованием стадии ПБР, проведения лимфодеплеции и инфузии рОИЛ пациенту показан в сочетании с параллельным процессом для мОИЛ.

Пример 6. Исследование для оценки репертуара V $\beta$  в мОИЛ и рОИЛ.

Оценивали различия репертуаров V $\beta$  Т-клеточного рецептора между мОИЛ и рОИЛ в отношении разнообразия и частоты встречаемости.

В данном исследовании собирали 6 пре-ПБР пар мОИЛ/рОИЛ для следующих форм рака: рака яичника; рака почки (n=2) и рака молочной железы (ТНРМЖ n=2, ЭР<sup>+</sup>ПР<sup>+</sup> n=1). Осадок клеток отправляли на сухом льду в iRepertoire (Huntsville, AL, USA) для экстракции РНК и секвенирования V $\beta$ .

Результаты данного исследования представлены на фиг. 9-10 и 14-16. В частности, на фиг. 9 и 10 представлен показатель разнообразия и % общих CDR3, соответственно. Кроме того, три графика клоно-типов, показывающих основные общие 50 CDR3, представлены на фиг. 14-16 для карциномы яичника, карциномы почки и трижды негативной карциномы молочной железы, соответственно.

Удивительно, но разнообразие репертуара TCRV $\beta$  более выражено в рОИЛ, чем в мОИЛ (фиг. 9). Примерно 30-50% всех CDR3 в мОИЛ и рОИЛ являются общими (фиг. 10), это свидетельствует о том, что большая процентная доля всех CDR3 дифференциально экспрессируется в этих двух популяциях. Однако из общих CDR3, главным образом, основные 50 клонов являются общими для двух популяций, это указывает на то, что мОИЛ и рОИЛ имеют клоны с аналогичной антигенной специфичностью (см. фиг. 14-16). Кроме того, частота встречаемости основных 50 клонов варьируется, опять-таки свидетельствуя о том, что мОИЛ и рОИЛ являются на удивление разными Т-клеточными популяциями.

Пример 7. Аналитическое исследование пролиферации при совместном культивировании.

Проводили оценку мОИЛ и рОИЛ с целью определения того, могут ли рОИЛ изменять статус пролиферации мОИЛ (или наоборот) при совместном культивировании.

В данном исследовании собирали 5 пре-ПБР пар мОИЛ/рОИЛ для следующих форм рака: рака почки, трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ), меланомы, рака легкого и колоректального

рака. рОИЛ выделяли из остатков опухоли путем 60-минутного ферментативного расщепления при 37°C. мОИЛ окрашивали CellTrace™ желтым, и рОИЛ окрашивали CellTrace™ красным для независимого отслеживания двух разных популяций. 1e6 мОИЛ, 5e5 мОИЛ+5e5 рОИЛ, и 1e6 рОИЛ культивировали в течение 4 дней при 37°C с IL-2 ± и ОКТ3 (анти-CD3 антитело) и оценивали пролиферацию методом точной цитометрии.

Результаты данного исследования представлены на фиг. 11. На фиг. 11 мОИЛ либо из CD4<sup>+</sup>, либо из CD8<sup>+</sup>, популяции в случае всех пяти опухолей демонстрировали усиление пролиферативной способности при совместном культивировании с рОИЛ и анти-CD3 антителом, на что указывает сдвиг (или разбавление красителя), наблюдаемый для красителя CellTrace™, в сравнении с одними мОИЛ. Красный цвет соответствует мОИЛ и синий цвет соответствует мОИЛ при совместном культивировании с рОИЛ.

Пример 8. Аналитическое исследование пролиферации при совместном культивировании.

Проводили оценку мОИЛ и рОИЛ с целью выявления сходства и/или различия в профиле генной экспрессии рОИЛ и мОИЛ.

В данном исследовании использовали технологию nCounter® NanoString, в которой применяется цветовой штрих-код, мультиплексированный на мРНК, для получения цифрового показателя экспрессии генов. Проводили гибридизацию очищенной РНК (RNeasy, Qiagen) из шести парных образцов мОИЛ и рОИЛ с кодовым набором панели nCounter® Immunology V2 в течение 16 ч в термоциклере. Кодовые наборы состоят из смеси захватывающих и репортерных зондов, которые образуют мультиплексы с целевой РНК путем 22-п.н. взаимодействий в процессе термоциклирования. Образцы наносили на 12-луночный картридж SPRINT и анализировали в устройстве nCounter® SPRINT. Данные подсчета экспортировали в пользовательском формате RCC и сопоставляли с файлом RLF, в котором названия генов соотнесены с идентификаторами зондов. Нормирование и анализ выполняли с помощью программы nSolver 3.0 (NanoString Technologies, Inc.).

Результаты данного исследования представлены на фиг. 12 и 13. Как показано на фиг. 12 и 13, профили генной экспрессии значительно отличаются при сравнении мОИЛ и рОИЛ (см. тепловую карту на фиг. 12). Есть несколько генов, экспрессия которых значительно повышена или снижена в рОИЛ в сравнении с мОИЛ (фиг. 13).

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения ремнантных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (рОИЛ) для адоптивной Т-клеточной терапии, включающий:

(a) получение от пациента ткани опухоли, содержащей опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ);

(b) фрагментирование ткани опухоли для получения фрагментированной ткани опухоли;

(c) обработку фрагментированной ткани опухоли в газопроницаемом контейнере первой средой для культивирования клеток и интерлейкином 2 (IL-2), с получением мигрирующих ОИЛ (мОИЛ) и остатков опухоли, содержащих ремнантные ОИЛ (рОИЛ);

(d) удаление, по меньшей мере, множества мОИЛ;

(e) ферментативное расщепление остатков опухоли на опухолевые ремнантные клетки с использованием расщепляющей смеси, где расщепляющая смесь содержит один или более из дезоксирибонуклеазы, коллагеназы и гиалуронидазы; и

(f) размножение опухолевых ремнантных клеток с использованием второй среды для культивирования клеток, содержащей среду для культивирования клеток, облученные питающие клетки, антитело ОКТ-3 и IL-2, в газопроницаемом контейнере, с получением размноженных рОИЛ,

при этом рОИЛ экспрессируют пониженные количества Т-клеточного маркера истощения в сравнении с мОИЛ и при этом Т-клеточный маркер истощения выбирают из группы, состоящей из TIM3, LAG3, TIGIT, PD-1, CTLA-4, а также их сочетаний.

2. Способ по п.1, при этом ткань опухоли выбирают из группы, состоящей из ткани опухоли меланомы, ткани опухоли головы и шеи, ткани опухоли молочной железы, ткани опухоли почки, ткани опухоли поджелудочной железы, ткани опухоли глиобластомы, ткани опухоли легкого, ткани колоректальной опухоли, ткани опухоли саркомы, ткани трижды негативной опухоли молочной железы, ткани опухоли шейки матки, ткани опухоли яичника, а также костного мозга или ткани опухоли при остром миелоидном лейкозе.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что облученные питающие клетки представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что IL-2 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 присутствует во второй среде для культивирования клеток в начальной концентрации примерно 30 нг/мл.

5. Способ по любому из пп.1-4, при этом количество по меньшей мере одного Т-клеточного маркера истощения в CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup> Т-клетках в рОИЛ уменьшено по меньшей мере на 10% в сравнении с мОИЛ.

6. Способ по любому из пп.1-5, при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер LAG3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках и при этом количество маркера LAG3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с мОИЛ.

7. Способ по любому из пп.1-6, при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD8<sup>+</sup> Т-клетках и при этом количество маркера TIM3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 3 раза в сравнении с мОИЛ.

8. Способ по любому из пп.1-7, при этом Т-клеточный маркер истощения представляет собой маркер TIM3 в CD4<sup>+</sup> Т-клетках и при этом количество маркера TIM3 в рОИЛ уменьшено по меньшей мере в 2 раза в сравнении с мОИЛ.

9. Способ по любому из пп.1-8, при этом маркер TIM3 и маркер LAG3 в рОИЛ не поддаются обнаружению методом проточной цитометрии.

10. Способ по любому из пп.1-9, при этом экспрессия CD56<sup>+</sup> в рОИЛ уменьшена по меньшей мере в 3 раза в сравнении с экспрессией CD56<sup>+</sup> в мОИЛ.

11. Способ по любому из пп.1-10, при этом экспрессия CD69<sup>+</sup> в рОИЛ увеличена по меньшей мере в 2 раза в сравнении с экспрессией CD69<sup>+</sup> в мОИЛ.

12. Способ по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетаний.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из IL-4, IL-7, IL-15, IL-21, а также их сочетаний.

14. Способ по любому из пп.1-13, дополнительно включающий этапы криоконсервирования размноженных рОИЛ для получения криоконсервированной популяции рОИЛ.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий этап размораживания криоконсервированной популяции рОИЛ.

16. Способ по любому из пп.1-15, отличающийся тем, что рОИЛ практически не содержат мОИЛ.

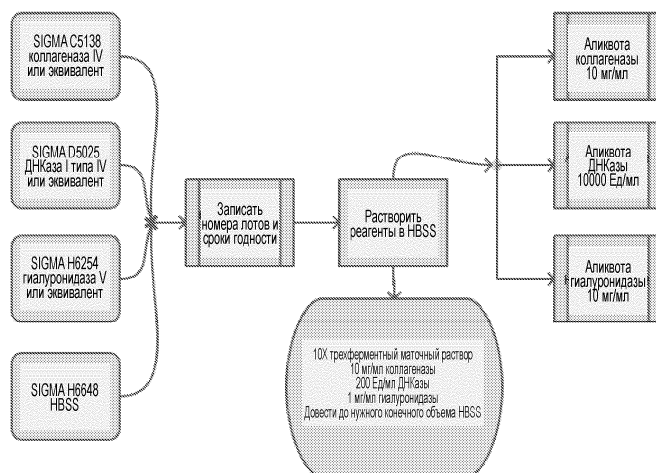
17. Способ по любому из пп.1-16, отличающийся тем, что этап размножения опухолевых ремnantных клеток во второй среде для культивирования клеток включает добавление мОИЛ во вторую среду для культивирования клеток с целью обеспечения выбранного соотношения рОИЛ и мОИЛ.

18. Способ по любому из пп.1-16, дополнительно включающий этап добавления мОИЛ к рОИЛ с целью обеспечения выбранного соотношения рОИЛ и мОИЛ.

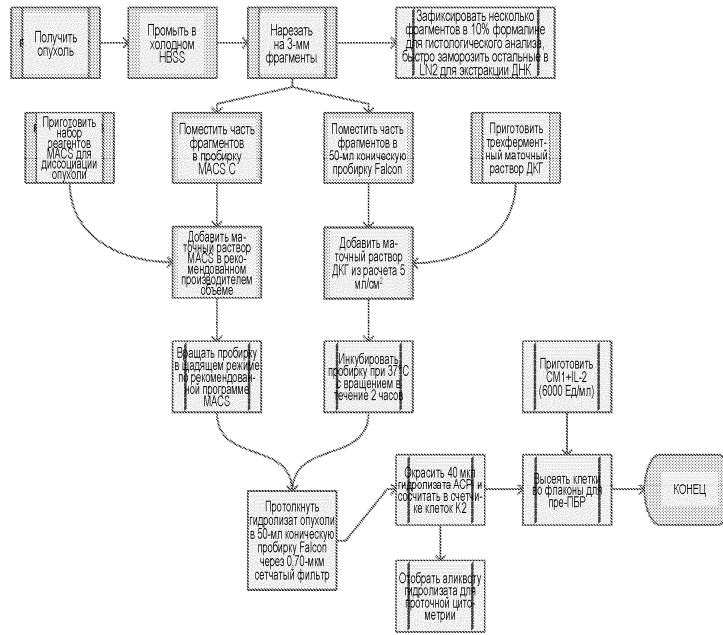
19. Способ по п.17 или 18, при этом выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ составляет по меньшей мере 1% рОИЛ относительно мОИЛ.

20. Способ по п.19, при этом выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ составляет не более 99,9% рОИЛ относительно мОИЛ.

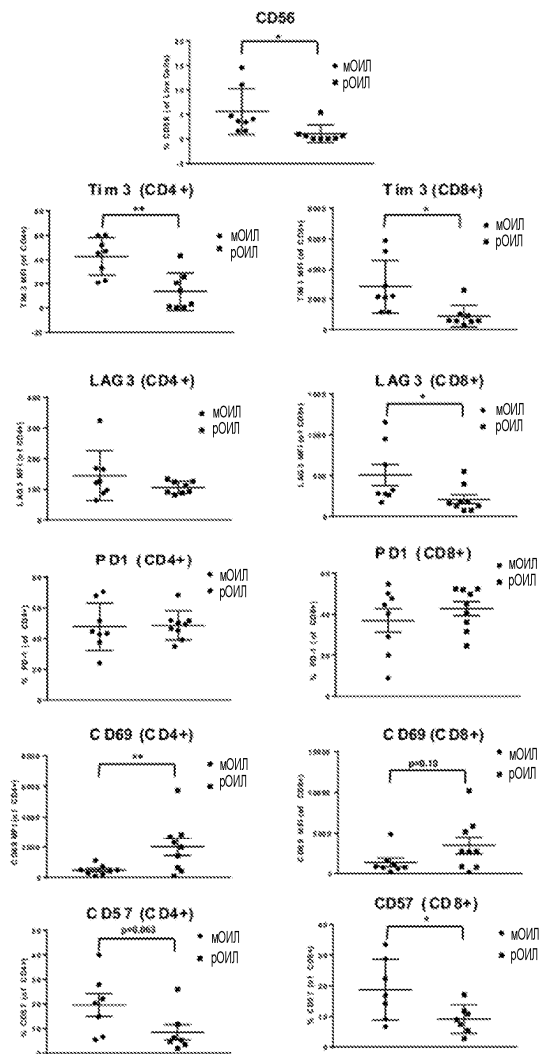
21. Способ по п.17 или 18, при этом выбранное соотношение рОИЛ и мОИЛ выбирают из группы, состоящей из примерно 1:99, примерно 5:95, примерно 10:90, примерно 15:85, примерно 20:80, примерно 25:75, примерно 30:70, примерно 35:65, примерно 40:60, примерно 45:55, примерно 50:50, примерно 55:45, примерно 60:40, примерно 65:35, примерно 70:30, примерно 75:25, примерно 80:20, примерно 85:15, примерно 90:10, примерно 95:5 и примерно 99:1 рОИЛ к мОИЛ.



Фиг. 1

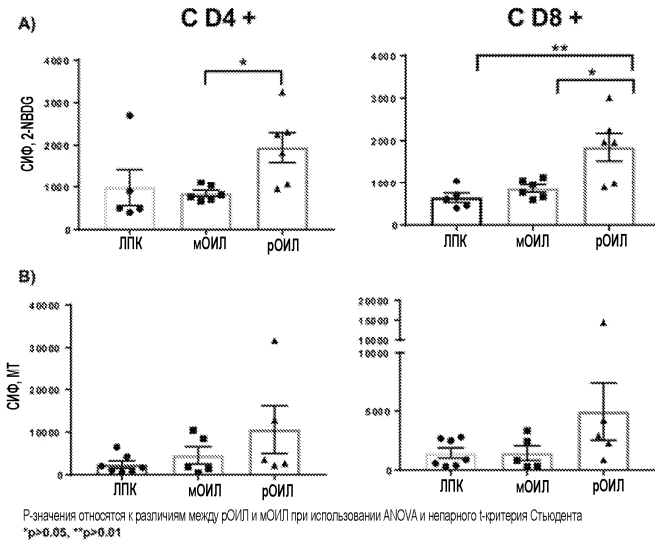


Фиг. 2

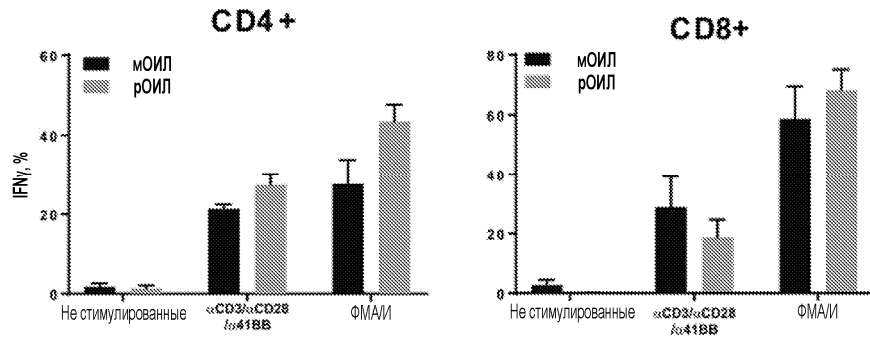


Результаты относятся к различиям между rOIP и MOIP при использовании непарного t-критерия Стьюдента; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .  
 p-значения, приближающиеся к уровню статистической значимости, индивидуально указаны выше

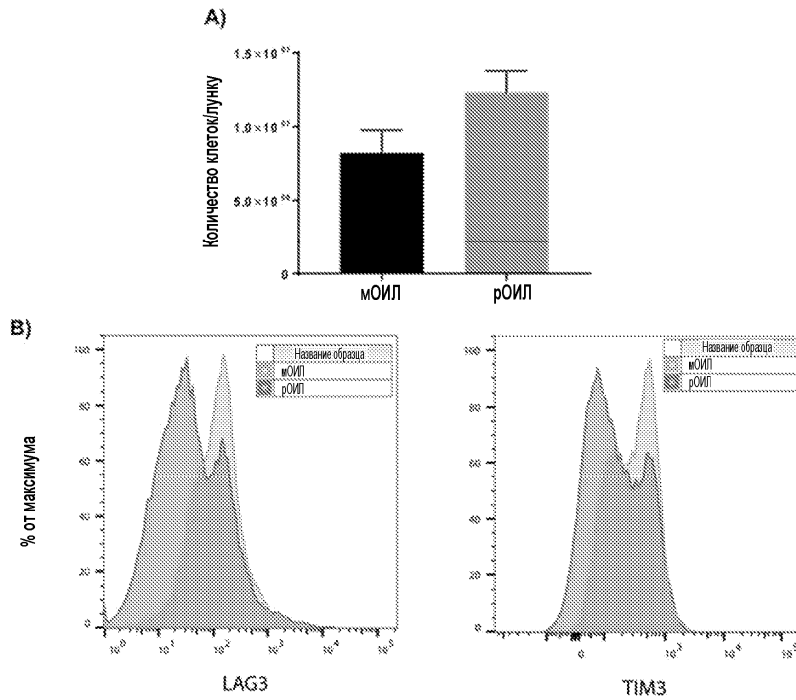
Фиг. 3



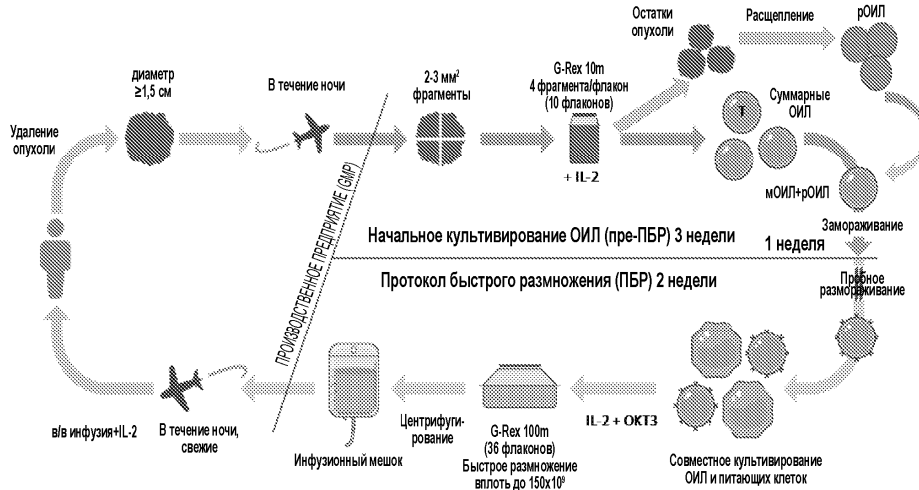
Фиг. 4



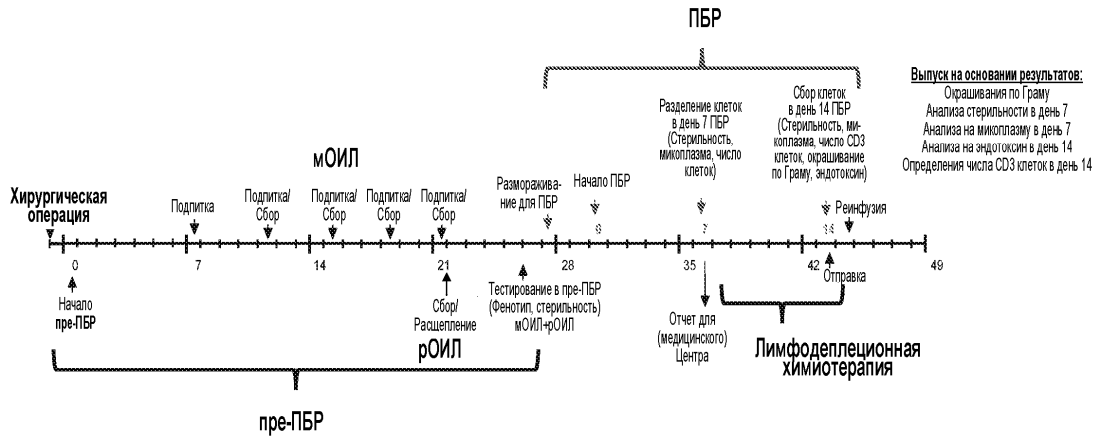
Фиг. 5



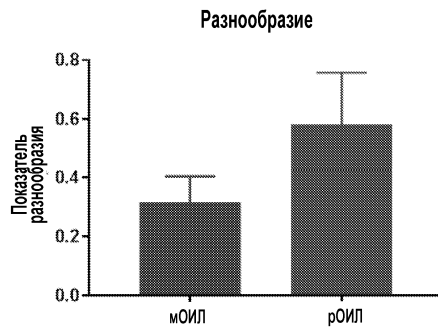
Фиг. 6



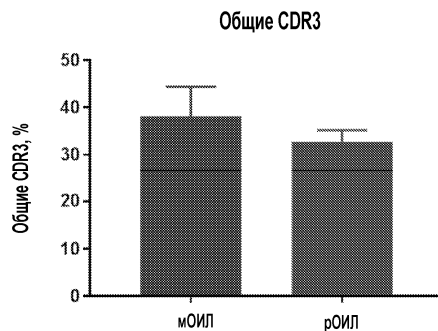
Фиг. 7



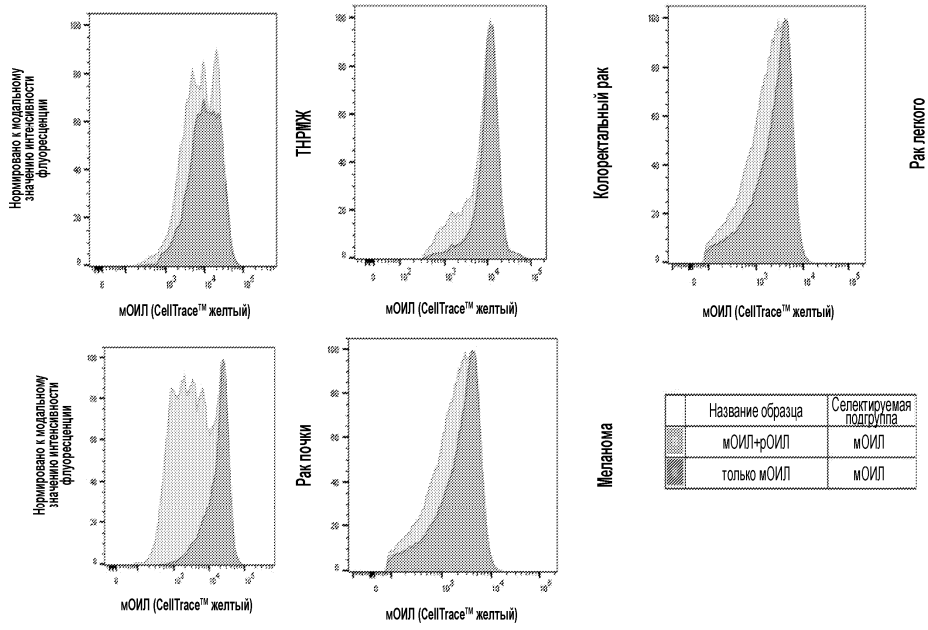
Фиг. 8



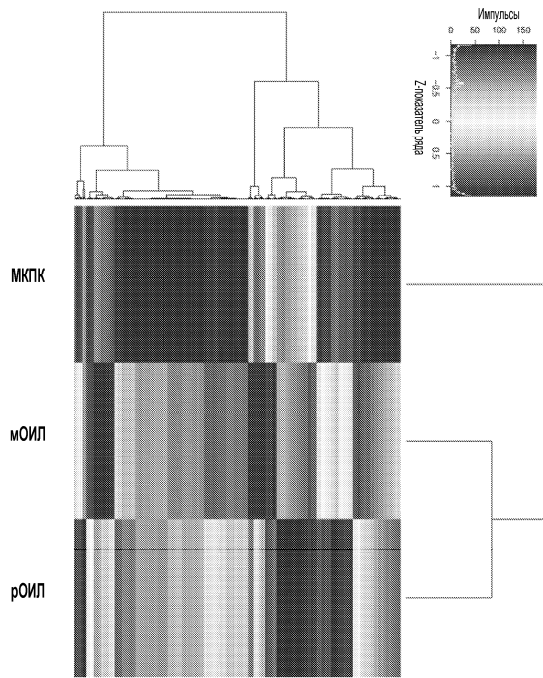
Фиг. 9



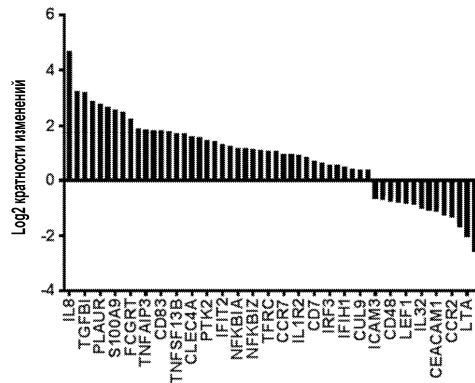
Фиг. 10



Фиг. 11

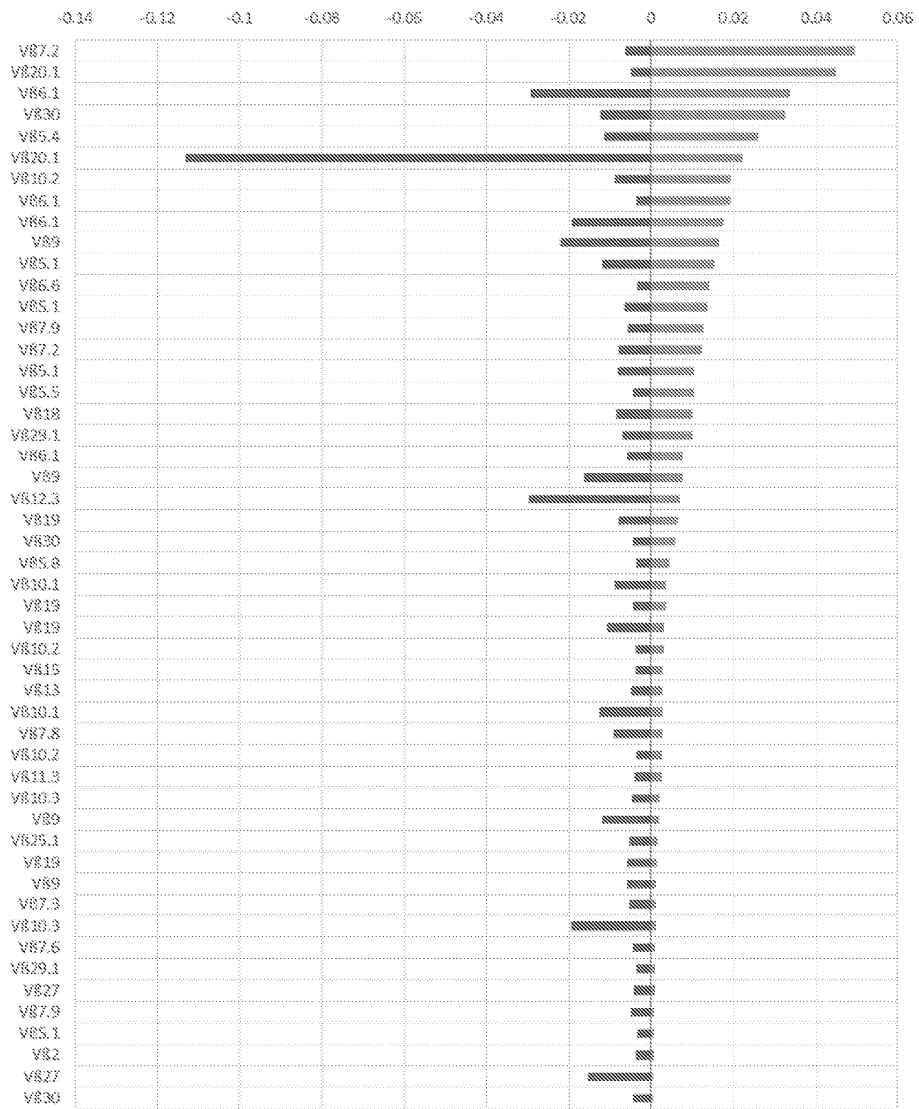


Фиг. 12

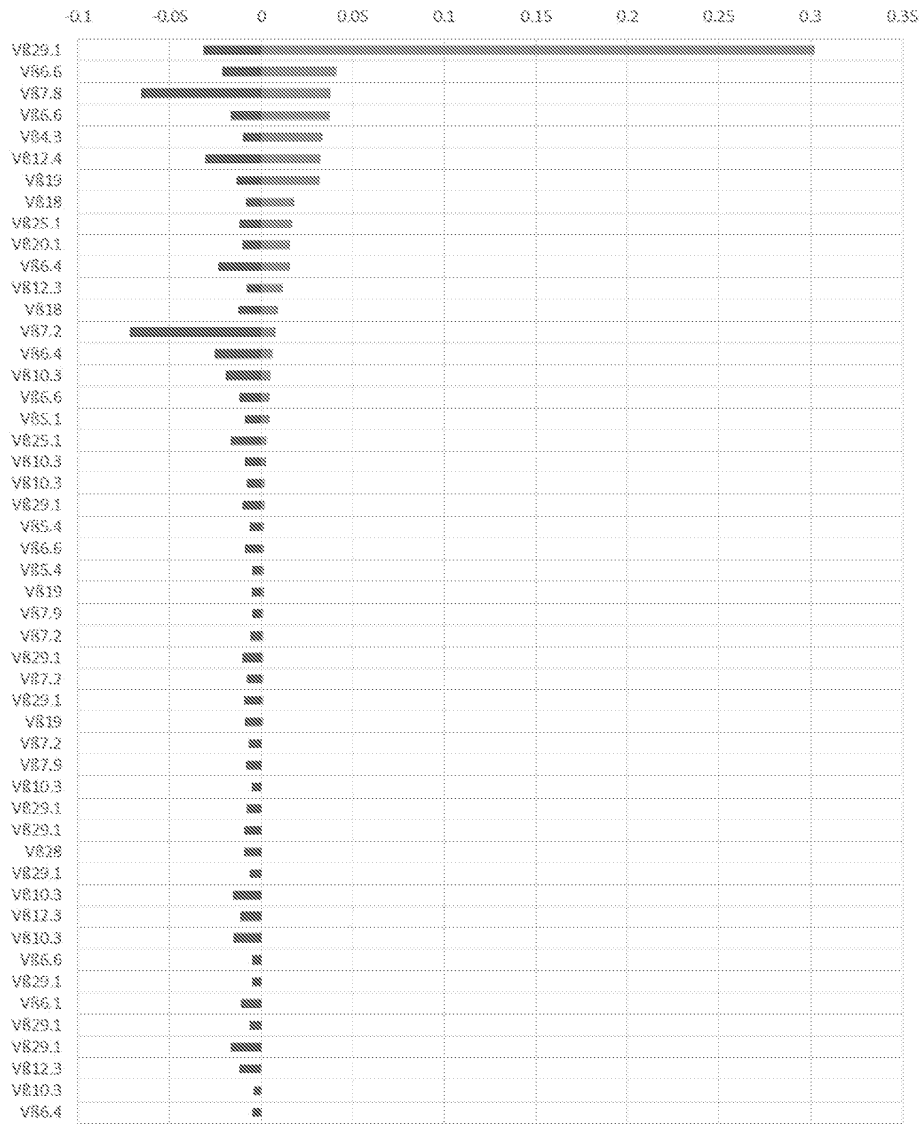


Фиг. 13

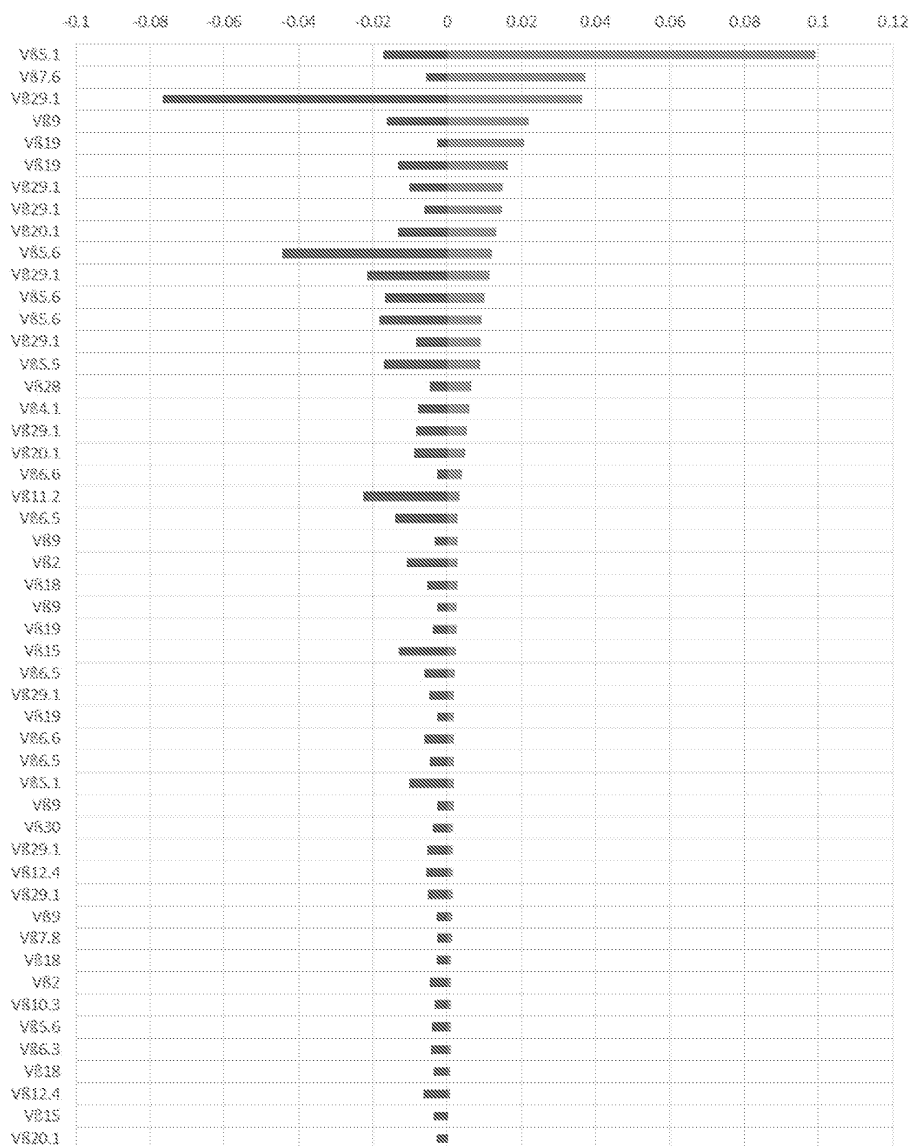




Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16

