



(51) МПК

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 35/17 (2006.01); A61K 39/0011 (2006.01); C12N 5/0636 (2006.01); C12N 5/0638 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2015138483, 30.04.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.04.2013Дата регистрации:
07.11.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.03.2013 US 61/771,247

(43) Дата публикации заявки: 13.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 07.11.2018 Бюл. № 31

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 01.10.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/038799 (30.04.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/133567 (04.09.2014)Адрес для переписки:
197101, Санкт-Петербург, а/я 128, "АРС-ПАТЕНТ", К.В. Осипов

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИЗ ОПУХОЛИ ОБОГАЩЕННЫХ ПОПУЛЯЦИЙ РЕАКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛИ Т-КЛЕТОК

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к способам введения клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, что может быть использовано в медицине. Способ включает в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (б) специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) 4-1 BB⁺/PD-1⁺, (ii) 4-1 BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1 BB⁺/TIM-3⁺ из общей популяции; и (с) отделение

(72) Автор(ы):

ГРОС Алена (US),
РОЗЕНБЕРГ Стивен А. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ ЮНАЙТЕД СТЕЙТС ОФ АМЕРИКА,
ЭЗ РЕПРЕЗЕНТЕД БАЙ ДЗЕ
СЕКРЕТАРИ, ДЕПАРТМЕНТ ОФ ХЕЛС
ЭНД ХЬЮМАН СЁРВИСЕЗ (US)(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: INOZUME T. et al., Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas enriches for tumor-reactive T-cells, J. Immunother., 2010, v.33, is.9, p.956-964.
PRIETO P.A., Enrichment of CD8+ Cells From Melanoma Tumor-infiltrating Lymphocyte Cultures Reveals Tumor Reactivity for Use in Adoptive Cell Therapy, J. Immunother., 2010, v.33, is.5, (см. прод.)

R U 2 6 7 1 8 9 7 C 2

R U 2 6 7 1 8 9 7 C 2

селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, которые также применяют для получения фармацевтической композиции. Изобретение позволяет получить популяцию клеток, реактивных в отношении опухолей, что позволяет с высокой эффективностью осуществлять терапию опухолей. 5 н. и 28 з.п. ф-лы, 8 ил., 2 табл., 6 пр.

(56) (продолжение):
p.547-556. US 2013/0052642 A1, 28.02.2013. RU 2367468 C2, 20.09.2009.

R U 2 6 7 1 8 9 7 C 2

R U 2 6 7 1 8 9 7 C 2

R U 2 6 7 1 8 9 7 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 671 897

(13) C2

(51) Int. Cl.

A61K 35/17 (2015.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 35/17 (2006.01); A61K 39/0011 (2006.01); C12N 5/0636 (2006.01); C12N 5/0638 (2006.01)

(21)(22) Application: 2015138483, 30.04.2013

(24) Effective date for property rights:
30.04.2013

Registration date:
07.11.2018

Priority:

(30) Convention priority:
01.03.2013 US 61/771,247

(43) Application published: 13.04.2017 Bull. № 11

(45) Date of publication: 07.11.2018 Bull. № 31

(85) Commencement of national phase: 01.10.2015

(86) PCT application:
US 2013/038799 (30.04.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/133567 (04.09.2014)

Mail address:
197101, Sankt-Peterburg, a/ya 128, "ARS-PATENT", K.V. Osipov

(72) Inventor(s):

GROS Alena (US),
ROZENBERG Stiven A. (US)

(73) Proprietor(s):

DZE YUNAJTED STEJTS OF AMERIKA, EZ
REPREZENTED BAJ DZE SEKRETARI,
DEPARTMENT OF KHELS END KHYUMAN
SERVISEZ (US)

(54) METHODS OF PRODUCING ENRICHED POPULATIONS OF TUMOUR-REACTIVE T CELLS FROM TUMOUR

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to methods of administering a cell population enriched with tumour-reactive T cells, which can be used in medicine. Method includes: (a) obtaining a bulk population of T cells from a tumour sample; (b) specifically selecting CD8+ T cells that are (I) 4-1 BB⁺/PD-1⁺, (II) 4-1 BB⁺/LAG-3⁺ or (III) 4-1

BB⁺/TIM-3⁺ from the bulk population; and (c) separating the cells selected in (b) from unselected cells to obtain a cell population enriched with tumour-reactive T cells, that are also used to produce a pharmaceutical composition.

EFFECT: invention makes it possible to obtain a population of tumour-reactive cells, which provides high effectiveness of treating tumours.

33 cl, 8 dwg, 2 tbl, 6 ex

Настоящее изобретение было создано при поддержке Правительства с № проекта ZIABC010984 Национальным институтом здоровья, Национальным институтом онкологии. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Перекрестная ссылка на родственную заявку

⁵ Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США №. 61/771247, поданной 1 марта 2013, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

¹⁰ Адоптивная клеточная терапия (англ. ACT) с использованием реактивных в отношении опухоли Т-клеток позволяет получать положительные клинические ответы у некоторых онкологических больных. Однако при этом сохраняются некоторые проблемы, препятствующие успешному применению ACT для лечения онкологических и других заболеваний. Например, Т-клетки, выделенные из опухоли, могут не обладать достаточной специфической реактивностью в отношении опухоли. Таким образом, ¹⁵ существует потребность в улучшенных способах получения из опухоли популяции реактивных в отношении опухоли Т-клеток.

Краткое описание сущности изобретения

²⁰ Вариант осуществления изобретения представляет способ получения популяции клеток, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, при этом способ включает в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (б) специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; и (с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками.

²⁵ Другой вариант осуществления изобретения представляет способ введения клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему, при этом способ включает в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (б) специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; (с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками; и (д) введение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему.

³⁵ Еще один вариант осуществления изобретения представляет способ получения фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками, при этом способ включает в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (б) специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-⁴⁰ 1BB и PD-1, из общей популяции; (с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками; и (д) объединение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками.

Другой вариант осуществления изобретения представляет клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клеткам, полученную при помощи способа, включающего в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца

опухоли; (б) специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; и (с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, для использования при введении клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему.

Дополнительные варианты осуществления изобретения представляют соответствующие популяции клеток и способы лечения или предупреждения онкологических заболеваний.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1А представляет собой график, отображающий процент CD3⁺/CD8⁺ клеток, изолированных из свежих образцов опухолей меланомы, экспрессирующих PD-1, TIM-3, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD25, CD28, CD27 или CD70. Каждая точка соответствует одной опухоли.

Фиг. 1В представляет собой график, отображающий кратность роста числа CD8⁺ клеток, изолированных из свежего образца опухоли меланомы (FrTu#1913), отсортированных на предмет наличия у них экспрессии CD8, PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB или недостаточной экспрессии PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB, после роста *in vitro* (REP) в течение 14 дней.

На Фиг. 2А-2Е показана секреция гамма-интерферона (IFN) (пг/мл) (черные столбики) или процент эffекторных Т-клеток (T_{eff}), экспрессирующих CD3, CD8 и 4-1BB (серые столбцы), при помощи клеток CD8⁺, изолированных из одного из пяти разных образцов опухоли меланомы (FrTu#1913 (А), FrTu#3550 (Б), FrTu#3289 (С), FrTu#2448 (Д) или FrTu#3713 (Е)). Клетки отсортировывали на предмет наличия экспрессии CD8, PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB или недостаточной экспрессии PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB, и выращивали *in vitro* в течение 14 дней. Секрецию гамма-интерферона (IFN) и экспрессию 4-1BB анализировали при совместном культивировании с аутологичными опухолевыми клеточными линиями.

На Фиг. 3А-3С показан специфический лизис (в процентах) опухолевых клеточных линий-мишеней TC1913 (аутологичных) (А), TC3289 (аллогенных) (В) или TC2448 (сингенных по HLA-A0201-антителам) (С) с помощью эffекторных CD8⁺ Т-клеток, изолированных из образца FrTu#1913 опухоли меланомы и отсортированных на предмет наличия в них экспрессии CD8 (незакрашенные кружки), PD-1 (черные кружки), TIM-3 (черные ромбики), LAG-3 (черные треугольники) или 4-1BB (черные квадраты) либо наличия недостаточной экспрессии PD-1 (серые кружки), TIM-3 (серые ромбики), LAG-3 (серые треугольники) или 4-1BB (серые квадраты), при указанных соотношениях эffектор : мишень.

На Фиг. 3D-3F показан специфический лизис (в процентах) опухолевых клеточных линий-мишеней TC3713 (аутологичных) (Д), TC3550 (аллогенных) (Е) или TC1379 (аллогенных) (F) с помощью эffекторных CD8⁺ Т-клеток, изолированных из образца опухоли меланомы FrTu#3713 (Д-Ф) и отсортированных на предмет наличия в них экспрессии CD8 (незакрашенные кружки), PD-1 (черные кружки), TIM-3 (черные ромбики) или 4-1BB (черные квадраты) или наличия недостаточной экспрессии PD-1 (серые кружки), TIM-3 (серые ромбики) или 4-1BB (серые квадраты), при указанных соотношениях эffектор:мишень.

На Фиг. 4А показано распознавание аутологичной опухоли клеток, выделенных из

опухоли меланомы (FrTu#3713), отсорттированных в отношении CD8⁺, PD-1⁺ PD-1⁻, 4-1BB⁺, 4-1BB⁻, 4-1BB^{+/PD-1⁻, 4-1BB^{+/PD-1⁺, 4-1BB^{+/PD-1⁺ или 4-1BB^{+/PD-1⁻ и выращенных ⁵ in vitro в течение 14 дней. Показан процент CD3⁺CD8⁺ клеток, экспрессирующих 4-1BB, после совместного культивирования с аутологичными опухолевыми клеточными линиями.}}}}

¹⁰ Фиг. 4В представляет собой график, показывающий процент CD3⁺CD8⁺ клеток, экспрессирующих 4-1BB (серые столбцы) или секрецирующих гамма-IFN (черные столбики), будучи изолированными из опухоли меланомы (FrTu#3612). Клетки отсорттировывали на предмет наличия в них CD8⁺, PD-1⁺, PD-1⁻, 4-1BB^{+/PD-1⁻, 4-1BB^{+/PD-1⁺, 4-1BB^{-/PD-1⁺ или 4-1BB^{-/PD-1⁻ популяций, выращивали in vitro в течение 14 дней, и на рисунке показана секреция гамма-IFN и усиление экспрессии 4-1BB после совместного культивирования с аутологичными опухолевыми клеточными линиями.}}}}

¹⁵ На Фиг. 5А-5С изображен специфический лизис в процентах опухолевых клеточных линий-мишеней TC3713 (аутологичных) (А), TC3550 (аллогенных) (В) и TC1379 (аллогенных) (С) с помощью эффекторных CD8⁺ клеток, выделенных из опухоли меланомы (FrTu#3713) и отсорттированных на предмет наличия в них популяций 4-²⁰ 1BB^{+/PD-1⁻ (кружки), 4-1BB^{+/PD-1⁺ (квадраты), 4-1BB^{+/PD-1⁺ (ромбочки) или 4-1BB^{+/PD-1⁻ (*), при соотношениях эффектор-мишень, показанных при измерении с помощью цитотоксического теста с радиоактивным ⁵¹Cr.}}}}

²⁵ Фиг. 6 представляет собой график, отображающий процент CD8⁺ клеток, экспрессирующих 4-1BB (серые столбцы) или секрецирующих гамма-IFN (черные столбики), выделенных из опухоли желудочно-кишечного тракта (FrTu#3446b), отсорттированных на предмет наличия в них популяций CD8⁺, PD-1⁺, PD-1⁻, TIM-3⁺, TIM-3⁻, 4-1BB⁺ или 4-1BB⁻ и выращенных в течение 21 дня в культуре. Показаны гамма-IFN и усиление экспрессии 4-1BB после совместного культивирования с аутологичными опухолевыми клеточными линиями.

³⁰ Фиг. 7А и 7В представляют собой графики, показывающие частоту встречаемости (%) уникальных аминокислотных последовательностей CDR3 (complementary determining region - комплементарно-определенная область) области бета-цепи TCR (англ. T Cell Receptor - Т-клеточные рецепторы) отсорттированных PD-1⁻ клеток (2985 TCR клонотипы) (А) или отсорттированных PD-1⁺ клеток (805 TCR клонотипы) (В) после роста в течение 14 дней in vitro.

³⁵ Фиг. 7С представляет собой график, показывающий частоту встречаемости (%) уникальных аминокислотных последовательностей CDR3 области бета-цепи TCR отсорттированных PD-1⁻ клеток (черные кружки) или отсорттированных PD-1⁺ клеток (серые кружки).

⁴⁰ Фиг. 8 представляет собой график, отображающий частоту встречаемости (%) клонотипов β-цепи TCR в PD-1⁻ популяции или в PD-1⁺ популяции, распознающих мутированные эпитопы p14ARF/p16INK4a (черные кружки) или HLA-A11mut (серые кружки), специфически экспрессируемые аутологичными опухолевыми клеточными линиями, и клонотипов с неизвестной реактивностью (незакрашенные кружки).

Подробное описание изобретения

Было установлено, что селектирование CD8⁺ клеток, также экспрессирующих один

или более из биомаркеров TIM-3 (T клетки, содержащей домены Ig и муцина 3), LAG-3 (гена активации лимфоцитов 3; CD223), 4-1BB (CD137) и PD-1 (CD279), обогащает реактивные в отношении опухоли T-клетки, изолированные из свежих опухолевых образцов. Селектирование CD8⁺ клеток, также экспрессирующих один или более из PD-1, 4-1BB, TIM-3 и LAG-3, предпочтительно обогащает большее число реактивных в отношении опухоли T-клеток по сравнению с CD8⁺ клетками, не экспрессирующими такие маркеры.

В этом смысле вариант осуществления изобретения представляет способ получения популяции клеток, обогащенной реактивными в отношении опухоли T-клетками, при этом способ включает в себя: (a) получение общей популяции T-клеток из образца опухоли; (b) специфическое селектирование CD8⁺ T-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; и (c) отделение селектированных на стадии (b) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли T-клетками. Способы согласно изобретению предпочтительно позволяют сократить время культивирования клеток *in vitro* перед введением их пациенту. Кроме того, способы согласно изобретению предпочтительно позволяют получать клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли T-клетками, которая может быть введена пациенту без необходимости проведения обследования для распознавания аутологичной опухоли.

Способ может включать в себя получение общей популяции T-клеток из образца опухоли при помощи любого подходящего способа, известного в данной области техники. Например, общая популяция T-клеток может быть получена из образца опухоли путем диссоциации образца опухоли с образованием клеточной суспензии, из которой могут быть селектированы специфические популяции клеток. Подходящие способы получения общей популяции T-клеток могут включать, не ограничиваясь перечнем, любой один или более из механической диссоциации (например, измельчения) опухоли, ферментативной диссоциации (например, дигерирования) опухоли и аспирации (такой как, например, с помощью иглы).

Общая популяция T-клеток, полученная из образца опухоли, может включать в себя любой подходящий тип T-клеток. Предпочтительно, общая популяция T-клеток, полученная из образца опухоли, включает в себя проникающие в опухоль лимфоциты (англ. TILs).

Образец опухоли может быть получен от любого млекопитающего. Если не указано иное, при использовании в данном контексте термин "млекопитающее" относится к любому млекопитающему, включая, но не ограничиваясь перечнем, млекопитающие отряда зайцеобразных (Logomorpha), такие как кролики; отряда хищных (Carnivora), включая кошачьих (Felines) (кошки) и псовых (Canines) (собаки); отряда парнокопытных (Artiodactyla), включая бычьих (Bovines) (коровы) и свинообразных (Swines) (свиньи); или отряда непарнокопытных (Perssodactyla), включая лошадиных (Equines) (лошади). Предпочтительно, чтобы млекопитающие были приматами, кроме человека, например, представителями отряда приматов (Primates), широконосых обезьян (Ceboids) или обезьяноподобных (Simoids) (обезьяны) или отряда высших приматов (Anthropoids) (люди и человекообразные обезьяны). Согласно некоторым вариантам осуществления, млекопитающее может быть млекопитающим отряда грызунов (Rodentia), таким как мыши и хомяки. Предпочтительно, млекопитающее является любым приматом, кроме человека, или человеком. Особенно предпочтительно, млекопитающее является человеком.

Способ может включать в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции. Согласно предпочтительному варианту осуществления, способ включает в себя селектирование клеток, также экспрессирующих CD3. Способ может включать в себя специфическое селектирование клеток любым подходящим способом. Предпочтительно, селектирование осуществляют с помощью проточной цитометрии. Проточную цитометрию можно выполнять при помощи любого подходящего способа, известного в данной области. При проточной цитометрии могут использоваться любые подходящие антитела и красители. Например, специфическое селектирование CD3, CD8, TIM-3, LAG-3, 4-1BB или PD-1 можно осуществляться с помощью антител анти-CD3, анти-CD8, анти-TIM-3, анти-LAG-3, анти-4-1BB или анти-PD-1, соответственно. Предпочтительно, антитело выбирают так, чтобы оно специфически распознавало и связывалось с конкретным выбранным биомаркером. Антитело или антитела могут быть присоединены к грануле (например, к магнитной грануле) или к флуорохрому.

Предпочтительно, проточная цитометрия представляет собой сортировку флуоресцентно-активированных клеток (англ. FACS).

Согласно варианту осуществления изобретения, специфическое селектирование может включать в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, являющихся положительными на предмет наличия в них экспрессии любого из TIM-3, LAG-3, 4-1BB или PD-1, любой комбинации двух или трех из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1 или всех четырех TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1. В этом отношении специфическое селектирование может включать в себя специфическое селектирование Т-клеток, являющихся моноположительными в плане наличия в них экспрессии любого из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, или специфическое селектирование Т-клеток, являющихся дважды, трижды или четырежды положительными в плане одновременной коэкспрессии любых двух, трех или четырех из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1. Согласно варианту осуществления изобретения, способ включает в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих TIM-3, из общей популяции. Согласно другому варианту осуществления, способ включает в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих LAG-3, из общей популяции. Согласно еще одному варианту осуществления, способ включает в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих 4-1BB, из общей популяции. Согласно еще одному варианту осуществления изобретения, способ включает в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих PD-1, из общей популяции. Дополнительный вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺, (ii) 4-1BB⁻/PD-1⁺ и/или (iii) 4-1BB⁺/PD-1⁻ из общей популяции. Другой вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) LAG-3⁺/PD-1⁺, (ii) LAG-3⁻/PD-1⁺ и/или (iii) LAG-3⁺/PD-1⁻, из общей популяции. Еще один вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/PD-1⁺, (ii) TIM-3⁻/PD-1⁺ или (iii) TIM-3⁺/PD-1⁻ из общей популяции. Еще один вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/LAG-3⁺,

(ii) TIM-3⁻/LAG-3⁺ или (iii) TIM-3⁺/LAG-3⁻, из общей популяции. Другой вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/LAG-3⁺, (ii) 4-1BB⁻/LAG-3⁺
5 или (iii) 4-1BB⁺/LAG-3⁻, из общей популяции. Еще один вариант осуществления изобретения представляет способ, включающий в себя специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/TIM-3⁺, (ii) 4-1BB⁻/TIM-3⁺ или (iii) 4-
1BB⁺/TIM-3⁻, из общей популяции. Согласно другому варианту осуществления
10 изобретения, любой из способов, описанных в данном контексте, может также включать в себя селектирование клеток, также экспрессирующих CD3⁺.

Согласно варианту осуществления изобретения, специфическое селектирование может включать в себя специфическое селектирование комбинаций CD8⁺ клеток, экспрессирующих любой из маркеров, описанных в данной работе. В этом отношении способ позволяет получить клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли клетками, включающую в себя смесь клеток, экспрессирующих любые два, три, четыре или более биомаркеров, описанных в данной работе. Согласно варианту осуществления изобретения, специфическое селектирование включает в себя специфическое селектирование любой из следующих комбинаций клеток: (a) PD-1⁺
20 клеток и 4-1BB⁺ клеток, (b) PD-1⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (c) PD-1⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (d) 4-1BB⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (e) 4-1BB⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (f) LAG-3⁺
25 клеток и TIM-3⁺ клеток, (g) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (h) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (i) PD-1⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток,
30 (j) 4-1BB⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток и/или (k) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток. Согласно другому варианту осуществления изобретения, любой из способов, описанных в данном контексте, может также включать в себя селектирование клеток, также экспрессирующих CD8⁺ и/или CD3⁺.

Способ может включать в себя отделение селектированных клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками. В этом отношении селектированные клетки могут быть физически отделены от неселектированных клеток. Селектированные клетки
35 могут быть отделены от неселектированных клеток при помощи любого подходящего способа, такого как, например, сортировка. Отделение селектированных клеток от неселектированных, предпочтительно, позволяет получить клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками.

Клеточные популяции, полученные при помощи способов согласно изобретению,
40 предпочтительно обогащены реактивными в отношении опухоли Т-клетками. В этом отношении клеточные популяции, полученные при помощи способов согласно изобретению, могут включать в себя больший процент реактивных в отношении опухоли Т-клеток по сравнению с клеточными популяциями, полученными без использования сортировки на наличие в них экспрессии любого одного или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1.

Согласно варианту осуществления изобретения, способ включает в себя получение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, без обследования для распознавания аутологичной опухоли. В этом отношении способы

согласно изобретению предпочтительно обеспечивают клеточную популяцию, обогащенную клетками, обладающими реактивностью в отношении опухоли, без необходимости тестирования клеток для распознавания аутологичной опухоли.

Согласно варианту осуществления изобретения, способ не включает в себя

- 5 неспецифическое стимулирование общей популяции Т-клеток перед специфическим селектированием клеток. В этом отношении способы согласно изобретению предпочтительно позволяют получать клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками, без неспецифической стимуляции общей популяции Т-клеток (например, с помощью антител анти-4-1BB, антител анти-
10 CD3, антител анти-CD28).

Согласно варианту осуществления изобретения, способ также включает в себя рост числа Т-клеток в обогащенной клеточной популяции, полученной при помощи способов согласно изобретению, *in vitro*. Численность Т-клеток может быть увеличена по меньшей мере 3-кратно (или 4-, 5-, 6-, 7-, 8- или 9-кратно), более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 10-кратно (или 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80- или 90-кратно), более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 100-кратно, более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 1000-кратно или, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно 100000-кратно. Численность Т-клеток может возрастать при помощи любого подходящего способа, известного в данной области техники.

- 15 20 Примеры способов роста численности клеток описаны в патентном документе США U.S. 8034334 и патентном документе США U.S. Patent Application Publication No. 2012/0244133, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно варианту осуществления изобретения, способ также включает в себя культивирование обогащенной клеточной популяции, полученной при помощи способов согласно изобретению, в присутствии любого одного или более из TWS119, интерлейкина (IL)-21, IL-12, IL-15, IL-7, трансформирующего ростового фактора (англ. TGF) бета и ингибитора АКТ (AKTi). Не будучи ограниченными какой-либо конкретной теорией, можно полагать, что культивирование обогащенной клеточной популяции в присутствии TWS119, IL-21 и/или IL-12 может, предпочтительно, усиливать реактивность в отношении опухоли обогащенной клеточной популяции путем предупреждения или торможения дифференциации обогащенной клеточной популяции.

- 25 30 35 Согласно варианту осуществления изобретения, способ также включает в себя трансдукцию или трансфекцию клеток обогащенной популяции, полученной при помощи любого из способов согласно изобретению, описанных в данном контексте, с помощью нуклеотидной последовательности, кодирующей любой один или более из IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 и анти-PD-1 миРНК.

Согласно варианту осуществления изобретения, способ также включает в себя стимуляцию обогащенной клеточной популяции, полученной при помощи способов согласно изобретению, с помощью ракового антигена и/или с помощью аутологичных опухолевых клеток. Стимуляция обогащенной клеточной популяции с помощью ракового антигена и/или с помощью аутологичных опухолевых клеток может осуществляться любым известным способом. Например, стимуляция обогащенной клеточной популяции может осуществляться путем физического контактирования обогащенной клеточной популяции с раковым антигеном и/или с аутологичными опухолевыми клетками. Не будучи ограниченными какой-либо конкретной теорией, можно полагать, что стимуляция обогащенной клеточной популяции с помощью ракового антигена и/или с помощью аутологичных опухолевых клеток может, предпочтительно, увеличивать реактивность в отношении опухоли обогащенной

клеточной популяции.

Термин "раковый антиген" при использовании в данном контексте относится к любой молекуле (например, белка, пептида, липида, углевода и так далее), исключительно или преимущественно экспрессируемой или сверхэкспрессируемой опухолевой клеткой или раковой клеткой, так что антиген связывается с опухолью или раком. Раковый антиген может дополнительно экспрессироваться нормальными, неопухолевыми или доброкачественными клетками. Однако в таких случаях экспрессия ракового антигена нормальными, неопухолевыми или доброкачественными клетками является не настолько эффективной, как экспрессия опухолевыми или раковыми клетками. В этом отношении опухолевые или раковые клетки могут сверхэкспрессировать антиген или экспрессировать антиген на значительно более высоком уровне по сравнению с экспрессией антигена нормальными, неопухолевыми или доброкачественными клетками. Кроме того, раковый антиген может дополнительно экспрессироваться клетками с разным уровнем развития или созревания. Например, раковый антиген может дополнительно экспрессироваться клетками на эмбриональной или фетальной стадии, каковые клетки при обычных условиях отсутствуют у взрослых. Или же, раковый антиген может дополнительно экспрессироваться стволовыми клетками или клетками-предшественниками, каковые клетки при обычных условиях отсутствуют у взрослых.

Раковый антиген может быть антигеном, экспрессируемым любой клеткой любого рака или опухоли, включая раки и опухоли, описанные в данном контексте. Раковый антиген может быть раковым антигеном только одного типа рака или опухоли, так что раковый антиген связан с или характерен для только одного типа рака или опухоли. Или же, раковый антиген может быть раковым антигеном (например, может быть характерным) для более чем одного типа рака или опухоли. Например, раковый антиген может экспрессироваться клетками рака молочной железы и рака предстательной железы и вообще не экспрессироваться нормальными, неопухолевыми или доброкачественными клетками. Примеры раковых антигенов могут включать в себя любой один или более из gp100, MART-1, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, NY-ESO-1, рецептора 2 сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR-2), HER-2, мезотелина и рецептора эпидерmalного фактора роста варианта III (EGFR III).

Способы согласно изобретению предпочтительно позволяют получать клеточные популяции, обогащенные реактивными в отношении опухоли Т-клетками. Т-клетки могут быть реактивными в отношении опухоли, вследствие чего они специфически распознают, лизируют и/или уничтожают опухолевые клетки. В этом отношении вариант осуществления изобретения представляет изолированную или очищенную клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками, полученную при помощи любого из способов согласно изобретению, описанных в данном контексте. Согласно варианту осуществления, изолированная или очищенная клеточная популяция включает в себя любой один или более из (a) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺ Т-клеток, (b) CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺ Т-клеток, (c) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁻ Т-клеток, (d) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁺ Т-клеток, (e) CD8⁺/LAG-3⁻/PD-1⁺ Т-клеток, (f) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁻ Т-клеток, (g) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁺ Т-клеток, (h) CD8⁺/TIM-3⁻/PD-1⁺ Т-клеток, (i) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁻ Т-клеток, (j) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁺ Т-клеток, (k) CD8⁺/TIM-3⁻/LAG-3⁺ Т-клеток, (l) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁻ Т-клеток, (m) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁺ Т-клеток, (n) CD8⁺/4-1BB⁻/LAG-3⁺ Т-клеток, (o) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁻ Т-клеток, (p) CD8⁺/4-1BB⁺/TIM-3⁺ Т-клеток, (q) CD8⁺/4-1BB⁺/TIM-3⁻

Т-клеток и (г) CD8⁺/4-1BB⁺/TIM-3⁻ Т-клеток, где клеточная популяция обогащена реактивными в отношении опухоли Т-клетками. Согласно другому варианту осуществления изобретения, изолированная или очищенная клеточная популяция включает в себя (а) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁺ Т-клетки, (б) CD8⁺/4-1BB⁻/PD-1⁺ Т-клетки, (с) CD8⁺/4-1BB⁺/PD-1⁻ Т-клетки, (д) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁺ Т-клетки, (е) CD8⁺/LAG-3⁻/PD-1⁺ Т-клетки, (ф) CD8⁺/LAG-3⁺/PD-1⁻ Т-клетки, (г) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁺ Т-клетки, (х) CD8⁺/TIM-3⁻/PD-1⁺ Т-клетки, (и) CD8⁺/TIM-3⁺/PD-1⁻ Т-клетки, (ж) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁺ Т-клетки, (к) CD8⁺/TIM-3⁻/LAG-3⁺ Т-клетки, (л) CD8⁺/TIM-3⁺/LAG-3⁻ Т-клетки, (м) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁺ Т-клетки, (н) CD8⁺/4-1BB⁻/LAG-3⁺ Т-клетки, (о) CD8⁺/4-1BB⁺/LAG-3⁻ Т-клетки, (р) CD8⁺/4-1BB⁺/TIM-3⁺ Т-клетки, (q) CD8⁺/4-1BB⁻/TIM-3⁺ Т-клетки или (r) CD8⁺/4-1BB⁺/TIM-3⁻ Т-клетки. Согласно другому варианту осуществления изобретения, любая из клеточных популяций, описанных в данном контексте, также может быть CD3⁺.

Согласно варианту осуществления изобретения, изолированная или очищенная клеточная популяция включает в себя смесь клеток, экспрессирующих любой из биомаркеров, описанных в данном контексте. Например, изолированная или очищенная клеточная популяция может включать в себя комбинацию (а) PD-1⁺ клеток и 4-1BB⁺ клеток, (б) PD-1⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (с) PD-1⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (д) 4-1BB⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (е) 4-1BB⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (ф) LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (г) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток и LAG-3⁺ клеток, (х) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (и) PD-1⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток, (ж) 4-1BB⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток и/или (к) PD-1⁺ клеток, 4-1BB⁺ клеток, LAG-3⁺ клеток и TIM-3⁺ клеток. Согласно другому варианту осуществления изобретения, любая из клеточных популяций, описанных в данном контексте, также может быть CD8⁺ и/или CD3⁺.

Термин "изолированный" при использовании в данном контексте означает удаление из его естественной среды. Термин "очищенный" при использовании в данном контексте означает повышение чистоты, где "чистота" является относительным понятием и ее не следует рассматривать как абсолютную чистоту. Например, чистота может составлять по меньшей мере приблизительно 50%, может превышать 60%, 70% или 80%, 90% или может составлять 100%.

Другой вариант осуществления изобретения представляет способ введения клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему, при этом способ включает в себя: (а) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (б) специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; (с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками; и (д) введение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему. Получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли, специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или

более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции и отделение селектированных клеток от неселектированных с получением клеточной популяции может осуществляться как описано в данном контексте в отношении других аспектов изобретения.

Способ может также включать в себя введение клеточной популяции, обогащенной реагентами в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему. Клеточную популяцию, обогащенную реагентами в отношении опухоли Т-клетками, можно вводить любым подходящим способом. Предпочтительно, клеточную популяцию, обогащенную реагентами в отношении опухоли Т-клетками, вводят путем инъекции, например, внутривенно.

Клеточная популяция согласно изобретению, обогащенная реагентами в отношении опухоли Т-клетками, может быть включена в состав композиции, такой как фармацевтическая композиция. В этом отношении изобретение представляет фармацевтическую композицию, содержащую любую из клеточных популяций, описанных в данном контексте, и фармацевтически приемлемый носитель.

Другой вариант осуществления изобретения представляет способ получения фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реагентами в отношении опухоли Т-клетками, при этом способ включает в себя: (a) получение общей популяции Т-клеток из образца опухоли; (b) специфическое

селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции; (c) отделение селектированных на стадии (b) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реагентами в отношении опухоли Т-клетками; и (d) объединение клеточной популяции, обогащенной реагентами в отношении опухоли Т-клетками, с фармацевтически приемлемым

носителем с получением фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реагентами в отношении опухоли Т-клетками. Получение

общей популяции Т-клеток из образца опухоли, специфическое селектирование CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих один или более из TIM-3, LAG-3, 4-1BB и PD-1, из общей популяции и отделение селектированных клеток от неселектированных с получением клеточной популяции может осуществляться как описано в данном контексте в

отношении других аспектов изобретения.

Способ может включать в себя объединение клеточной популяции, обогащенной реагентами в отношении опухоли Т-клетками, с фармацевтически приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реагентами в отношении опухоли Т-клетками.

Предпочтительно, носитель является фармацевтически приемлемым носителем. В том, что касается фармацевтических композиций, носитель может быть любым носителем, обычно используемым для введения клеток. Такие фармацевтически приемлемые носители хорошо известны специалистам в данной области техники и легко доступны неограниченному кругу лиц. Предпочтительно, чтобы фармацевтически приемлемый носитель не имел вредных побочных эффектов или был нетоксичным в условиях применения. Подходящий фармацевтически приемлемый носитель для инъекции клеток может включать в себя любой изотонический носитель, такой как, например,

физиологический раствор (приблизительно 0,90 масс/об. % NaCl в воде, приблизительно 300 мОsm/л NaCl в воде или приблизительно 9,0 г NaCl на л воды), раствор электролита NORMOSOL R (Abbott, Chicago, IL), PLASMA-LYTE A (Baxter, Deerfield, IL),

приблизительно 5% раствор декстрозы в воде или лактат Рингера. Согласно варианту осуществления, фармацевтически приемлемый носитель добавляют с человеческим сывороточным альбумином.

Применительно к изобретению, вводимая доза, например, количество клеток в клеточной популяции согласно изобретению, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, должна быть достаточной для оказания воздействия, например, вызывания терапевтического или профилактического ответа, у млекопитающего в течение объективно необходимого времени. Например, количество клеток должно быть достаточным для связывания с раковым антигеном или выявления, лечения или предупреждения рака в течение приблизительно от 2 часов или больше, например, от 12 до 24 или больше часов, от момента введения. Согласно некоторым вариантам осуществления, временной промежуток может быть еще большим. Число клеток будет определено в зависимости от, например, эффективности конкретных клеток и состояния млекопитающего (например, человека), а также массы тела млекопитающего (например, человека), подлежащего лечению.

В данной области техники известно множество методов анализа, позволяющих определять вводимое число клеток из клеточной популяции согласно изобретению, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками. Применительно к изобретению, для определения начального вводимого млекопитающему числа клеток может быть использован анализ, основанный на сравнении того, насколько лизированы клетки-мишени или секretирован один или более цитокин, такой как, например, IFN- γ и IL-2, при введении данного числа таких клеток млекопитающему из группы

млекопитающих, каждому из которых вводили разное число клеток. Степень, до которой лизированы клетки-мишени или секреции цитокины, такие как, например, IFN- γ и IL-2, при введении определенного числа клеток, может быть оценена с помощью известных способов. Секреция цитокинов, таких как, например, IL-2, также может давать представление относительно качества (например, фенотипа и/или эффективности) клеточного препарата.

Число клеток в клеточной популяции согласно изобретению, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, также может быть определено по наличию, природе и продолжительности каких-либо вредных побочных действий, которые могут сопровождать введение конкретной клеточной популяции. Как правило, решение относительно числа клеток, необходимых для лечения конкретного пациента, будет принимать лечащий врач с учетом целого ряда факторов, таких как возраст, масса тела, общее состояние здоровья, питание, пол, способ введения и серьезность заболевания, подлежащего лечению. В качестве примера и без намерения ограничивать изобретение, число клеток может составлять приблизительно от 10×10^6 до 10×10^{11} клеток на инфузию, приблизительно от 10×10^9 клеток до 10×10^{11} клеток на инфузию или от 10×10^7 приблизительно до 10×10^9 клеток на инфузию. Клеточные популяции, полученные при помощи способов согласно изобретению, предпочтительно, могут позволять осуществлять эффективное лечение или предупреждение рака.

Предполагается, что клеточные популяции, полученные при помощи способов согласно изобретению, могут быть использованы в способах лечения или предупреждения онкологических заболеваний. В этом отношении изобретение представляет способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, включающий в себя введение млекопитающему фармацевтических композиций или клеточных популяций, полученных при помощи любого из способов согласно изобретению, описанных в данном контексте, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения возникновения рака у млекопитающего. Другой вариант осуществления изобретения представляет способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего,

включающий в себя введение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему при помощи любого из способов согласно изобретению, описанных в данном контексте, в количестве, эффективном для лечения или предупреждения возникновения рака у млекопитающего.

- 5 Термины "лечить" и "предупреждать", а также однокоренные с ними слова при использовании в данном контексте не следует понимать как 100% или полное излечение или предупреждение. Скорее, имеют место различные степени лечения или предупреждения, которые средний специалист в данной области расценит как имеющие потенциальный положительный или терапевтический эффект. В этом отношении,
- 10 способы согласно изобретению могут обеспечивать любую степень или любой уровень лечения или предупреждения рака у млекопитающего. Кроме того, лечение или предупреждение, достигнутые при помощи способа согласно изобретению, могут включать в себя лечение или предупреждение одного или более состояний или симптомов заболевания, например, рака, подлежащих лечению или предупреждению. Кроме того,
- 15 в рамках данного изобретения "предупреждение" может охватывать замедление наступления заболевания или симптома или его состояния.

Применительно к способам изобретения, согласно которым вводят популяции клеток, клетки могут быть клетками, аллогенными или аутологичными млекопитающему. Предпочтительно, клетки являются аутологичными млекопитающему.

- 20 Вариант осуществления изобретения также включает в себя противолимфомную терапию млекопитающего перед введением любых обогащенных клеточных популяций, полученных при помощи любого из способов согласно изобретению, описанных в данном контексте. Примеры противолимфомной терапии включают, но могут не ограничиваться перечнем, немиелоаблативную противолимфомную химиотерапию,
- 25 миелоаблативную противолимфомную химиотерапию, общее облучение всего организма и так далее

Применительно к способам изобретения, рак может быть любой злокачественной опухолью, включая любые саркомы (например, синовиальная саркома, остеосаркома, лейомиосаркома матки и альвеолярная рабдомиосаркома), лимфомы (например,

- 30 лимфома Ходжкина и енходжкинская лимфома), гепатоклеточную карциному, глиому, рак головы и шеи, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелолейкоз, рак костей, рак мозга, рак молочной железы, рак ануса, анального канала или колоректальный рак, рак глаза, рак внутрипеченочных желчных протоков, рак суставов, рак шеи, желчного пузыря или плевры, рак носа, носовой полости или среднего уха, рак полости рта, рак вульвы, хронический лимфолейкоз, хронический миелоидный лейкоз, рак толстой кишки (например, карцинома толстой кишки), рак пищевода, рак шейки матки, рак желудочно-кишечного тракта (например, карциноидная опухоль желудочно-кишечного тракта), рак гортаноглотки, рак гортани, рак печени, рак легких, злокачественную мезотелиому, меланому, множественную миелому, рак носоглотки,
- 35 рак яичников, рак поджелудочной железы, рак брюшной полости, опухоли сальника и брыжейки, рак глотки, рак предстательной железы, рак прямой кишки, рак почки, рак тонкой кишки, рак мягких тканей, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак мочеточника и рак мочевого пузыря.

Следующие примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, однако их,

- 45 разумеется, не следует рассматривать как каким бы то ни было образом ограничивающие его объем.

Описание примеров осуществления изобретения

Пример 1

Этот пример демонстрирует частоту встречаемости CD3⁺/CD8⁺ клеток в свежем образце гидролизата опухоли меланомы, экспрессирующих PD-1, TIM-3, LAG-3 или 4-1BB. Этот пример также показывает коэкспрессию 1) TIM-3 и PD-1, 2) LAG-3 и PD-1 и 5 3) LAG-3 и TIM-3 CD8⁺ Т-клетками, изолированными из свежего образца опухоли меланомы. Кроме того, этот пример демонстрирует экспрессию PD-1, TIM-3 или LAG-3 реактивными MART-1₂₇₋₃₅ клетками.

Суспензии отдельных клеток, полученные механическим и ферментативным гидролизом свежего образца опухоли меланомы, размораживали и выстаивали в течение 10 ночи при 1×10^6 клеток/мл в отсутствии цитокинов. Клетки окрашивали и измеряли процент CD3⁺CD8⁺ клеток, экспрессирующих PD-1, TIM-3, LAG-3, 4-1BB, OX40, CD25, CD28, CD27 или CD70 при помощи проточной цитометрии. Результаты представлены на Фиг. 1А. Как показано на Фиг. 1А, CD3⁺/CD8⁺ клетки из свежего образца гидролизата 15 опухоли могут экспрессировать PD-1, TIM-3, LAG-3 или 4-1BB.

В отдельном опыте клетки получали из свежих образцов двух разных меланомных опухолей и измеряли коэкспрессию TIM-3 и PD-1, коэкспрессию LAG-3 и PD-1 и коэкспрессию LAG-3 и TIM-3 с помощью проточной цитометрии на живых клетках и 20 CD3⁺ CD8⁺ клетках. Результаты показали, что субпопуляции CD8⁺ Т-клеток, проникающие в меланомные опухоли, коэкспрессируют 1) TIM-3 и PD-1, 2) LAG-3 и PD-1 и 3) LAG-3 и TIM-3.

В отдельном опыте измеряли экспрессию PD-1, TIM-3 или LAG-3 на MART-1₂₇₋₃₅ 25 реактивных Т-клетках с помощью проточной цитометрии на живых клетках и CD3⁺ CD8⁺ клетках и сравнивали с экспрессией CD3⁺ CD8⁺ Т-клеток, которые не были MART-1₂₇₋₃₅ реактивными. Результаты показали, что MART-1₂₇₋₃₅ реактивные клетки, проникающие в меланомные опухоли, экспрессируют более высокие уровни PD-1, TIM-3 30 и LAG-3 по сравнению с CD3⁺ CD8⁺ Т-клетками, которые были нереактивными в отношении MART-1₂₇₋₃₅.

Пример 2

Этот пример демонстрируют способ специфического селектирования CD3⁺ CD8⁺ клеток, также экспрессирующих один из PD-1, TIM-3, LAG-3 и 4-1BB, и рост числа селектированных клеток.

Суспензию отдельных клеток, полученных из свежего образца опухоли меланомы (FrTu#1913), размораживали и выстаивали в течение ночи в отсутствии цитокинов, после чего окрашивали. Клетки сортировали в следующие CD3⁺ популяции, используя антитела анти-CD3, анти-CD8, анти-PD-1, TIM-3, LAG-3 и 4-1BB: CD8⁺, CD8⁺/PD-1⁺, CD8⁺/LAG3⁺, 35 CD8⁺/TIM-3⁺, CD8⁺/4-1BB⁺, CD8⁺/PD-1⁻, CD8⁺/LAG3⁻, CD8⁺/TIM-3⁻ или CD8⁺/4-1BB⁻ путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Затем численность клеток увеличивали, используя протокол быстрого расширения (200-кратно избыточно облученные фидеры, 30 нг/мл анти-CD3 и 500 CU/мл IL-2), и измеряли кратность роста изолированных популяций. Результаты представлены на Фиг. 1В. Как показано на 40 Фиг. 1В, число CD8⁺ клеток, также экспрессирующих один из PD-1, TIM-3, LAG-3 и 4-1BB, также возросло.

Пример 3

Этот пример демонстрирует реактивность *in vitro* Т-клеток, изолированных из

свежего образца опухоли меланомы и отсортированных на предмет наличия экспрессии CD8 и одного из PD-1, LAG-3, TIM-3 и 4-1BB.

Усиление экспрессии 4-1BB является показателем стимуляции TCR. Было установлено, что после возрастания числа Т-клеток и в отсутствии TCR стимуляции экспрессия 4-

5 1BB утрачивается. Кроме того, наблюдалось, что после роста числа клеток и совместного культивирования с аутологичной опухолевой клеточной линией Т-клетки, ранее утратившие экспрессию 4-1BB и стимулированные при помощи опухолевой клеточной линии, будут реэкспрессировать 4-1BB. Соответственно, экспрессию 4-1BB измеряют через 24 часа после совместного культивирования с аутологичной опухолью

10 в качестве маркера TCR стимуляции в сравнении с аутологичной опухолевой клеточной линией.

Суспензию отдельных клеток из свежего образца гидролизата опухоли меланомы (FrTu#1913) выставали в течение ночи без цитокинов и сортировали на предмет наличия

15 в них популяций: CD8⁺, CD8⁺/PD-1⁺, CD8⁺/LAG3⁺, CD8⁺/TIM-3⁺, CD8⁺/4-1BB⁺, CD8⁺/PD-1⁻,

15 CD8⁺/LAG3⁻, CD8⁺/TIM-3⁻ или CD8⁺/4-1BB⁻ популяции при помощи FACS, как описано в Примере 3. Численность отсортированных клеток возрастила *in vitro* в течение 14 дней. На 14 день клетки промывали и совместно культивировали в сравнении с

аутологичной опухолевой клеточной линией (1×10^5 эффекторы: 1×10^5 клетки-мишени).

20 Реактивность количественно оценивали при помощи высвобождения гамма-IFN и процента CD8⁺ клеток, экспрессирующих 4-1BB, через 24 часа после совместного культивирования с аутологичной опухолевой клеточной линией (TC1913) и аллогенными (Аллоген.) опухолевыми клеточными линиями. Процент CD8⁺ клеток, распознающих 25 специфически мутированный эпитоп (CDKn2A), являющийся мишенью для Т-клеток, также оценивали количественно, сравнивая тетramer с этим специфическим эпитопом. Результаты представлены в Таблицах 1 и 2 и на Фиг. 2A-2E.

Таблица 1

	T-клетки	TC 1913	TC191	FrTu#1	FrTu#1	TC 624	TC	TC 624	TC	TC2	TC18	TC13	TC23	ОКТ3 (0.1 мкг/мл)	
						CIITA	624	CIITA	2119	448	65	79	01		
30						Allogeneic h. * A020 1	W6/ 32	A * A020 1	Allogeneic en. * A020 1	Allogeneic en. * A020 1	Allogeneic en. * A020 1	Allogeneic en. * A11			
35															
	CD8 ⁺	31 (0.7)	77 (0.8)	0 (0.8)	<u>398</u> (1.1)	83 (0.6)	<u>14598</u> (2.2)	40 (0.8)	<u>9626</u> (2.1)	<u>2127</u> (0.7)	<u>1845</u> (1.5)	318 (2.3)	<u>1760</u> (2.0)	<u>606</u> (1.1)	<u>84824</u> (91.1)
	PD-1 ⁺	11 (0.4)	<u>26696</u> (42.2)	<u>851</u> <u>(16.9)</u>	<u>4108</u> <u>(45.0)</u>	<u>363</u> (4.4)	0 (0.2)	0 (0.3)	0 (0.5) (1.6)	<u>1766</u> (0.8)	0 (0.3)	0 (0.3) (3.0)	0 (0.3) (1.9)	<u>266</u> (2.1)	<u>45319</u> (92.2)
40	PD-1-	0 (0.1)	0 (0.4)	0 (0.2)	27 (0.5)	13 (0.2)	<u>11103</u> (2.9)	0 (0.5)	<u>9986</u> (1.6)	78 (0.2)	105 (0.7)	<u>1456</u> (3.0)	<u>424</u> (1.9)	<u>355</u> (1.2)	<u>79037</u> (91.9)
	LAG-3 ⁺	0 (0.1)	<u>55291</u> (49.0)	<u>2345</u> (25.3)	<u>6485</u> (45.7)	<u>449</u> (4.3)	0 (0.1)	0 (0.1)	0 (0.1) (0.8)	<u>412</u> (0.1)	0 (0.1)	0 (0.3) (0.8)	0 (0.2) (0.1)	0 (0.1) (92.9)	<u>86689</u>
	LAG-3-	4 (0.4)	53 (n.d.)	0 (0.5)	<u>225</u> (1.1)	45 (0.4)	<u>17820</u> (3.7)	20 (0.9)	<u>14872</u> (2.9)	<u>532</u> (0.7)	91 (0.6)	<u>922</u> (4.8)	<u>808</u> (3.9)	<u>570</u> (1.7)	<u>78940</u> (91.6)
45	T _{eff} FrTu#1913														
	TIM-3 ⁺	0 (0.1)	<u>25472</u> (53.4)	<u>1000</u> (17.9)	<u>4761</u> (60.0)	310 (5.4)	0 (0.1)	0 (0.1)	0 (0.1) (2.0)	<u>3545</u> (1.6)	7 (1.6)	0 (0.1) (4.8)	0 (0.1) (3.9)	<u>500</u> (1.5)	53519 (96.2)
	TIM-3-	0 (0.1)	11 (0.6)	0 (0.1)	136 (0.6)	41 (0.2)	<u>8092</u> (2.5)	0 (0.3)	<u>6316</u> (1.6)	<u>1614</u> (0.2)	<u>467</u> (0.9)	<u>1050</u> (4.1)	<u>1167</u> (4.5)	160 (1.3)	>166 6

															(91.1)
5	41BB	572 +(8.8)	23845 (31.3)	589 (13.4)	4581 (33.9)	952 (11.1)	6364 (3.7)	217 (4.2)	7043 (6.2)	21207 (6.5)	882 (3.5)	526 (4.9)	294 (4.9)	> 1666 (3.3)	71272 (82.7)
	41BB	22 -(0.2)	10 (0.4)	6 (0.2) (0.6)	106 (0.6)	44 (0.1)	11892 (3.4)	46 (0.6)	11705 (2.4)	4227 (0.8)	562 (1.6)	1147 (4.5)	1035 (8.0)	87 (1.3)	88381 (88.5)

Увеличенную *in vitro* численность эффекторных популяций, изолированных из свежего образца гидролизата опухоли и отсортированных в соответствии с экспрессией указанных маркеров клеточной поверхности, совместно культивировали в сравнении с аутологичными (Аут.) опухолевыми клеточными линиями (TC1913) и аллогоенными (Аллоген.) опухолевыми клеточными линиями. Показана реактивность гамма-IFN (пг/мл). Величины в скобках соответствуют проценту CD3+ CD8+ клеток, которые усиливали экспрессию CD137 (41BB) через 24 часа после совместного культивирования. Опухолевые клеточные линии (TC) 624 CIITA, 2119, 2448 и 1865 распределяют HLA A*0201 аллель с TC1913, а ТС 1379 распределяет A*11 с TC1913. ТС2301 представляет собой аллогоенный контроль (не совпадающий для всех антигенов лейкоцитов человека HLA), используемый в качестве отрицательного контроля.

*Контрольный A*11 рестриктированный пептид из CRKRS гена, распознавание по RCTIL 3309.
Величины >200 пг/мл и более чем в два раза превышающие фон считали положительными, они выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

Таблица 2

		Т-клетки	Аут. TC1913 A 0201	Аут. TC1913 * W6/32	Аллогоен. TC2301	COS A11 1 мкМ нерел. пептид	COS A11 1 мкМ CDKN2A _{mut.t}	
20	FrTu#1913	PD1+	0 (2.1)	9633 (46.1)	57 (12.9)	268 (3.1)	9 (1.3)	17762 (30.3)
		PD1-	0 (0.5)	0 (1.0)	0 (0.9)	176 (3.2)	69 (0.7)	68 (0.6)
		LAG-3+	0 (1.3)	15290 (61.2)	221 (16.5)	0 (0.6)	0 (1.0)	23587 (55.7)
		LAG-3-	0 (1.7)	0 (1.2)	0 (1.4)	632 (4.2)	363 (1.3)	427 (1.4)
		TIM-3+	0 (1.2)	11954 (58)	102 (11.4)	1190 (2.9)	0 (0.5)	21140 (56.3)
		TIM-3-	0 (0.8)	0 (1.0)	0 (0.9)	79 (3.0)	100 (0.5)	92 (0.4)
		41BB+	55 (10.3)	6418 (39.6)	44 (10.0)	1767 (11.2)	11 (1.7)	12557 (19.5)
		41BB-	0 (0.6)	0 (1.0)	0 (0.8)	106 (2.7)	1874 (1.3)	2026 (1.4)

30 Увеличенную *in vitro* численность эффекторных популяций, изолированных из свежего образца гидролизата опухоли и отсортированных в соответствии с экспрессией указанных маркеров клеточной поверхности, совместно культивировали в сравнении с аутологичными опухолевыми клеточными линиями (TC1913) и аллогоенной опухолевой клеточной линией (TC2301) в качестве негативного контроля и COS A11 клетками, активированными неревелантным (неревел.) пептидом или мутанты (мут.) пептидом. Показана реактивность при помощи IFN-гамма (пг/мл). Величины в скобках соответствуют проценту CD3+ CD8+ клеток, которые усиливали экспрессию CD137 (41BB) через 24 часа после совместного культивирования. Величины >200 пг/мл и более чем в два раза превышающие фон, считали положительными, они выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

35 Как показано в Таблицах 1 и 2, Т-клетки, изолированные из свежего образца опухоли меланомы и отсортированные на предмет наличия экспрессии CD8 и одного из PD-1, LAG-3, TIM-3 и 4-1BB, обладают реактивностью в отношении аутологичных опухолевых клеточных линий, определяемой на основании секреции гамма-IFN, экспрессии 4-1BB и процента клеток, распознающих CDKN2A. Как показано на Фиг. 2А-2Е, Т-клетки, изолированные из каждого из пяти разных свежих образцов меланомной опухоли и отсортированные на предмет наличия экспрессии CD8 и одного из PD-1, LAG-3, TIM-3 и 4-1BB, обладают реактивностью в отношении аутологичных опухолевых клеточных линий, определяемой на основании секреции гамма-IFN и экспрессии 4-1BB.

40 45 В отдельном опыте клетки изолировали из двух независимых свежих образцов меланомной опухоли (FrTu#1913 and FrTu#3713) и сортировали на предмет наличия экспрессии CD8 и экспрессии PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB, как описано в Примере 3. Численность отсортированных клеток возрастила в течение 14 дней *in vitro*. На 15 день

клеточные линии-мишени (аутологичные и аллогенные) помечали изотопом ^{51}Cr и совместно культивировали в течение 4 часов с эффекторными клетками в соотношениях, указанных на Фиг. 3A-3F. Высвобождение ^{51}Cr определяли в трех параллельных опытах при помощи гамма-метрии и вычисляли специфический лизис в процентах по следующей формуле: [(экспериментальное число импульсов в минуту (англ. cpm) (имп/мин) - спонтанное cpm) / (максимальное cpm - спонтанное cpm)] × 100. Результаты представлены на Фиг. 3A-3F. Как показано на Фиг. 3A-3F, клетки, отсортированные на предмет наличия в них экспрессии PD-1, LAG-3, TIM-3 или 4-1BB, были способны к лизису на аутологичных опухолевых клеточных линиях.

Пример 4

Этот пример демонстрирует реактивность CD8 $^{+}$ клеток, изолированных из образца меланомной опухоли и отсортированных на предмет наличия экспрессии 4-1BB и/или PD-1.

Клетки изолировали из свежих образцов меланомных опухолей от 3 пациентов и сортировали на предмет наличия в них CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{-}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{+}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{-}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{-}$ или CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ популяций при помощи FACS. Отсортированные клетки сокультивировали с аутологичными опухолевыми клетками и измеряли усиление экспрессии 4-1BB при помощи проточной цитометрии. Для всех трех образцов опухолей результаты показали, что Т-клетки, распознающие аутологичную опухоль (как было определено на основании усиления экспрессии 4-1BB), содержатся в однопозитивных клетках, экспрессирующих PD-1 $^{+}$ или 4-1BB $^{+}$, однако самая высокая частота встречаемости реактивных в отношении опухоли клеток (определенная на основании усиления экспрессии 4-1BB) была получена в случае популяции, коэкспрессирующей 4-1BB и PD-1 в свежем образце гидролизата опухоли меланомы.

В отдельном опыте клетки изолировали из свежего образца опухоли меланомы (FrTu#1913), отсортировывали на предмет наличия в них CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{+}$ и CD3 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ популяций при помощи FACS и из отсортированных клеток формировали клоны. Клоны сокультивировали с аутологичными опухолевыми клеточными линиями, определяли усиление экспрессии 4-1BB при помощи проточной цитометрии и измеряли секрецию гамма-IFN. Результаты показали, что самая высокая частота встречаемости реактивных в отношении опухоли клонов (определенная на основании усиления экспрессии 4-1BB и измерения секреции гамма-IFN) была получена в случае популяции, коэкспрессирующей PD-1 и 4-1BB.

В другом опыте суспензию отдельных клеток меланомной опухоли FrTu#3713 выставляли в течение ночи без цитокинов, после чего клетки отсортировывали на предмет наличия в них CD8 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{-}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{-}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ популяций при помощи FACS. Суспензию отдельных клеток меланомной опухоли FrTu#3612 выставляли в течение ночи без цитокинов, после чего клетки отсортировывали на предмет наличия в них CD8 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /PD-1 $^{-}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{-}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{+}$ /PD-1 $^{+}$, CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{+}$ и CD8 $^{+}$ /4-1BB $^{-}$ /PD-1 $^{-}$ популяций при помощи FACS. Численность отсортированных клеток выращивали в течение 14 дней *in vitro*. На 14 день клетки

промывали, совместно культивировали по отношению к аутологичной опухолевой клеточной линии (1×10^5 эффекторов: 1×10^5 клетки-мишени) и оценивали реактивность путем количественного определения процента $CD8^+$ клеток, экспрессирующих 4-1BB (FrTu#3612 и FrTu#3713) и/или величины секреции гамма-IFN (FrTu#3612) через 24 часа после сокультивирования. Результаты представлены на Фиг. 4А и 4В. Как показано на Фиг. 4А, клетки, отсортированные на предмет наличия в них двойной позитивной коэкспрессии PD-1 и 4-1BB, имеют такие же уровни усиления экспрессии 4-1BB, как были получены в случае клеток, отсортированных на основании однопозитивной экспрессии PD-1 или 4-1BB. Как показано на Фиг. 4В, клетки, отсортированные на предмет наличия в них двойной позитивной коэкспрессии PD-1 и 4-1BB, имели такие же уровни усиления экспрессии 4-1BB и уровня секреции гамма-IFN, как и клетки, отсортированные на основании однопозитивной экспрессии PD-1.

В отдельном опыте клетки, изолированные из меланомной опухоли FrTu#3713, сортировали на предмет наличия в них $CD8^+/4-1BB^+/PD-1^-$, $CD8^+/4-1BB^+/PD-1^+$, $CD8^+/4-1BB^-/PD-1^+$ и $CD8^+/4-1BB^-/PD-1^-$ популяций при помощи FACS. Численность отсортированных клеток выращивали в течение 14 дней *in vitro*. На 15 день клеточные линии-мишени (аутологичные и аллогенные) помечали изотопом ^{51}Cr и совместно культивировали в течение 4 часов с эффекторными клетками в соотношениях, указанных на Фиг. 5А-5С. Высвобождение ^{51}Cr определяли в трех параллельных опытах при помощи гамма-метрии и вычисляли специфический лизис в процентах по следующей формуле: [(экспериментальное срт - спонтанное срт) / (максимальное срт - спонтанное срт)] × 100. Результаты представлены на Фиг. 5А-5С. Как показано на Фиг. 5А-5С, клетки, отсортированные на предмет наличия в них одинарной позитивной экспрессии 4-1BB $^+$, одинарной позитивной экспрессии PD-1 $^+$ или двойной позитивной экспрессии 4-1BB $^+/PD-1^+$, способны лизировать аутологичные опухолевые клетки *in vitro*.

Пример 5

Этот пример демонстрирует реактивность $CD8^+$ клеток, изолированных из образца опухоли желудочно-кишечного тракта (англ. GI) и отсортированных на предмет наличия экспрессии PD-1, TIM-3 или 4-1BB.

Суспензию отдельных клеток из свежего образца опухоли желудочно-кишечного тракта (англ. GI) (FrTu#3446b) выставляли в течение ночи без цитокинов и сортировали в соответствии с экспрессией PD-1, TIM-3 или 4-1BB при помощи FACS. Численность отсортированных клеток выращивали *in vitro* в течение 14 дней. На 14 день клетки промывали, сокультивировали по отношению к аутологичной опухолевой клеточной линии (1×10^5 эффекторы: 1×10^5 клетки-мишени) и количественно оценивали реактивность на основании высвобождения гамма-IFN и процентного содержания $CD8^+$ клеток, экспрессирующих 4-1BB, через 24 часа после совместного культивирования. Результаты представлены на Фиг. 6. Как показано на Фиг. 6, клетки, отсортированные в соответствии с экспрессией PD-1, TIM-3 или 4-1BB, продемонстрировали более высокую реактивность в отношении опухоли, определяемую на основании экспрессии 4-1BB, по сравнению с клеточными популяциями, не обладающими экспрессией PD-1, TIM-3 или 4-1BB, соответственно. Хотя секрецию гамма-IFN не регистрировали, специфическое усиление экспрессии 4-1BB показывает, что клетки были реактивными в отношении опухоли.

Пример 6

Этот пример показывает, что отсортированные PD-1⁺ клетки являются более олигоклональными, чем PD-1⁻ клетки после роста численности клеток *in vitro*. Этот пример также показывает, что отсортированные PD-1⁺ клетки содержат нацеленные на клоны мутированные эпитопы, экспрессированные аутологичной опухолью после роста численности клеток *in vitro*.

Суспензию отдельных клеток из свежего образца гидролизата опухоли меланомы (FrTu#1913) выставляли в течение ночи без цитокинов и сортировали в соответствии с экспрессией PD-1 при помощи FACS. Численность отсортированных клеток выращивали *in vitro* в течение 14 дней. Бета-цепь TCR (T-клеточных рецепторов) РНК экстрагировали при помощи набора для выделения РНК μMACS RNA (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Осуществляли синтез кДНК и 5'RACE. Штрих-коды наносили на концы продукта PCR при помощи PCR для идентификации образцов. Продукт PCR промывали и подсчитывали размер библиотеки. Выполняли глубокое секвенирование (Illumina, Inc., San Diego, CA).

Определяли частоту встречаемости каждой уникальной аминокислотной последовательности CDR3 области бета-цепи TCR в популяции. Результаты представлены на Фиг. 7A-7C. Как показано на Фиг. 7A-7C, отсортированные PD-1⁺ клетки являются более олигоклональными, чем PD-1⁻ клетки после роста численности клеток *in vitro*.

20 20 наиболее часто встречающихся клонотипов в PD-1⁺ популяции представлены на Фиг. 8. Как показано на Фиг. 8, наиболее часто встречающиеся клонотипы бета-цепи TCR в отсортированных PD-1⁺ клетках после роста численности клеток редко встречались в PD-Г фракции. Как показано на Фиг. 8, клоны, распознавающие мутированные эпитопы, экспрессируемые аутологичной опухолевой клеточной линией, были найдены в пределах 20 наиболее часто встречающихся клонов в PD-1⁺ популяции и очень редко встречались в PD-1⁻ популяции. Эти результаты показывают, что реактивные в отношении опухоли нацеленные на клоны мутированные эпитопы изначально экспрессировали PD-1 в свежем образце опухоли.

30 Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, процитированные в данном документе, тем самым включены в настоящий документ посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была перечислена по отдельности и конкретно для включения ее посредством ссылки и была представлена здесь во всей своей полноте.

35 Использование артиклей "a" и "an" и "the", а также сочетаний "по меньшей мере один" и подобных обозначений в контексте описания изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) следует интерпретировать, как охватывающее единственное и множественное число, если в документе не указано иное или нет явного противоречия с контекстом. Использование термина "по меньшей мере один" с последующим перечислением одного или более компонентов (например, "по меньшей мере один из А и В") следует интерпретировать для обозначения одного компонента, выбранного из перечисленных компонентов (А или В) или любой комбинации двух или более из перечисленных компонентов (А и В), если в документе не указано иное или нет явного противоречия с контекстом. Термины "включающий в себя," "имеющий," "имеющий в своем составе" и "содержащий" следует рассматривать как неограничивающие термины (то есть означающие "включающий, не ограничиваясь перечнем"), если не указано иное. Перечисление диапазона значений в данном контексте служит исключительно в качестве сокращенного способа обращения к каждой отдельной

величине, попадающей в указанный диапазон, если в документе не указано иное, при этом каждая отдельная величина включена в описание, как если бы она была отдельно упомянута в данном документе. Все способы, описанные в данном контексте, могут быть выполнены в любой подходящей последовательности, если в документе не указано иное или нет иного явного противоречия с контекстом. Использование всех без исключения примеров или приводимой в качестве примера формулировки (например, "такие как"), представленных в данном контексте, предназначено исключительно для лучшего освещения и не ориентировано на ограничение объема изобретения, если не заявляется иное. Никакие формулировки в описании не следует рассматривать, как указание на какой-либо незаявляемый элемент, как существенный для практического осуществления изобретения.

В данном контексте описаны предпочтительные варианты осуществления данного изобретения, включая наилучшее известное авторам техническое выполнение изобретения. Изменения таких предпочтительных вариантов осуществления изобретения будут очевидными для специалистов в данной области после прочтения предшествующего описания. Авторы изобретения ожидают, что специалисты смогут использовать такие изменения по мере необходимости, при этом авторы изобретения предполагают, что изобретение может применяться на практике и иначе, чем конкретно описано в данном контексте. Соответственно, авторы изобретения включают все модификации и эквиваленты предмета изобретения, содержащегося в формуле изобретения, прилагаемой к нему, как допустимые применяемыми правовыми нормами. Вследствие этого, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных вариантах включена в изобретение, если в документе не указано иное или нет явного противоречия с контекстом.

(57) Формула изобретения

1. Способ введения клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, млекопитающему, включающий:

(а) получение общей популяции Т-клеток из образца указанной опухоли, где образец

указанной опухоли содержит CD8+ Т-клетки, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺ (ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺;

(b) специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺,

(ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺, из общей популяции;

(c) отделение селектированных на стадии (b) клеток от неселектированных с получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками; и

(d) введение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками, млекопитающему путем инъекции.

2. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками, включающий:

(а) получение общей популяции Т-клеток из образца указанной опухоли, где образец указанной опухоли содержит CD8+ Т-клетки, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺, (ii)

45 (iii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺;

(b) специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺,

(ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺, из общей популяции;

(c) отделение селектированных на стадии (b) клеток от неселектированных с

получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками; и

(d) объединение эффективного количества клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками, с фармацевтически

5 приемлемым носителем с получением фармацевтической композиции, содержащей клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками.

10 3. Способ по любому из пп. 1, 2, где (b) дополнительно включает специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, экспрессирующих два или более из TIM-3, LAG-3 и PD-1, из общей популяции.

4. Способ по любому из пп. 1, 2, где (b) дополнительно включает специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, представляющих собой LAG-3⁺/PD-1⁺ или TIM-3⁺/PD-1⁺, из общей популяции.

15 5. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/PD-1⁺, из общей популяции.

6. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) LAG-3⁺/PD-1⁺, (ii) LAG-3⁻/PD-1⁺ и/или (iii) LAG-3⁺/PD-1⁻, из общей популяции.

20 7. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/PD-1⁺, (ii) TIM-3⁻/PD-1⁺ или (iii) TIM-3⁺/PD-1⁻, из общей популяции.

25 8. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/LAG-3⁺, (ii) TIM-3⁻/LAG-3⁺ или (iii) TIM-3⁺/LAG-3⁻, из общей популяции.

30 9. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/LAG-3⁺, из общей популяции.

10. Способ по любому из пп. 1, 2, где стадия (b) включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/TIM-3⁺, из общей популяции.

35 11. Способ по любому из пп. 1, 2, где клеточную популяцию, обогащенную реактивными в отношении опухоли Т-клетками, получают без обследования для распознавания аутологичной опухоли.

12. Способ по любому из пп. 1, 2, где к общей популяции Т-клеток не применяют неспецифической стимуляции перед стадией (b).

13. Способ по любому из пп. 1, 2, дополнительно включающий в себя рост числа Т-клеток в обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c).

40 14. Способ по любому из пп. 1, 2, дополнительно включающий в себя культивирование обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c), в присутствии любого одного или более из TWS119, интерлейкина (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7, трансформирующего ростового фактора (TGF) бета и ингибитора АКТ (AKTi).

45 15. Способ по любому из пп. 1, 2, дополнительно включающий в себя стимуляцию обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c), с помощью ракового антигена и/или с помощью аутологичных опухолевых клеток.

16. Способ по любому из пп. 1, 2, дополнительно включающий в себя трансдукцию или трансфекцию клеток обогащенной популяции, полученной на стадии (c), с помощью нуклеотидной последовательности, кодирующей любой один или более из IL-12, IL-7,

IL-15, IL-2, IL-21, mir155 и анти-PD-1 миРНК.

17. Способ лечения или предупреждения рака у млекопитающего, нуждающегося в этом, включающий:

(а) получение фармацевтической композиции способом по п. 2 и введение указанной 5 популяции клеток или фармацевтической композиции млекопитающему в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака у млекопитающего; или

(б) введение популяции клеток, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками, млекопитающему способом по п. 1 в количестве, эффективном для лечения или предупреждения рака у млекопитающего.

10 18. Применение клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении опухоли Т-клетками, полученной при помощи способа, включающего:

(а) получение общей популяции Т-клеток из образца указанной опухоли, где образец 15 указанной опухоли содержит CD8+ Т-клетки, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺, (ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺;

(б) специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) 4-1BB⁺/PD-1⁺, (ii) 4-1BB⁺/LAG-3⁺ или (iii) 4-1BB⁺/TIM-3⁺, из общей популяции; и

(с) отделение селектированных на стадии (б) клеток от неселектированных с 20 получением клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками,

для получения лекарственного средства для введения клеточной популяции, обогащенной реактивными в отношении указанной опухоли Т-клетками, млекопитающему.

25 19. Применение по п. 18, где (б) дополнительно включает специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, экспрессирующих два или более из TIM-3, LAG-3 и PD-1, из общей популяции.

20 20. Применение по п. 18, где (б) дополнительно включает специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, представляющих собой LAG-3⁺/PD-1⁺ или TIM-3⁺/PD-1⁺, из общей популяции.

21. Применение по п. 18, где стадия (б) включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/PD-1⁺, из общей популяции.

22. Применение по п. 18, где стадия (б) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) LAG-3⁺/PD-1⁺, (ii) LAG-3⁻/PD-1⁺ 35 и/или (iii) LAG-3⁺/PD-1⁻, из общей популяции.

23. Применение по п. 18, где стадия (б) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/PD-1⁺, (ii) TIM-3⁻/PD-1⁺ или (iii) TIM-3⁺/PD-1⁻, из общей популяции.

24. Применение по п. 18, где стадия (б) дополнительно включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются (i) TIM-3⁺/LAG-3⁺, (ii) TIM-3⁻/LAG-3⁺ или (iii) TIM-3⁺/LAG-3⁻, из общей популяции.

25. Применение по п. 18, где стадия (б) включает в себя специфическое селектирование 45 CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/LAG-3⁺, из общей популяции.

26. Применение по п. 18, где стадия (б) включает в себя специфическое селектирование CD8+ Т-клеток, которые являются 4-1BB⁺/TIM-3⁺, из общей популяции.

27. Применение по п. 18, где клеточную популяцию, обогащенную реактивными в

отношении опухоли Т-клетками, получают без обследования для распознавания аутологичной опухоли.

28. Применение по п. 18, где к общей популяции Т-клеток не применяют неспецифической стимуляции перед стадией (b).

⁵ 29. Применение по п. 18, дополнительно включающее в себя рост числа Т-клеток в обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c).

30. Применение по п. 18, дополнительно включающее в себя культивирование обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c), в присутствии любого одного или более из TWS119, интерлейкина (IL-21), IL-12, IL-15, IL-7,

¹⁰ трансформирующего ростового фактора (TGF) бета и ингибитора АКТ (AKTi).

31. Применение по п. 18, дополнительно включающее в себя стимуляцию обогащенной клеточной популяции, полученной на стадии (c), с помощью опухолевого антигена и/или с помощью аутологичных опухолевых Т-клеток.

¹⁵ 32. Применение по п. 18, дополнительно включающее в себя трансдукцию или трансфекцию клеток обогащенной популяции, полученной на стадии (c), с помощью нуклеотидной последовательности, кодирующей любой один или более из IL-12, IL-7, IL-15, IL-2, IL-21, mir155 и анти-PD-1 миРНК.

33. Применение фармацевтической композиции, полученной при помощи способа по п. 2, или применение по п. 18, для получения лекарственного средства для

²⁰ терапевтического или профилактического лечения рака.

25

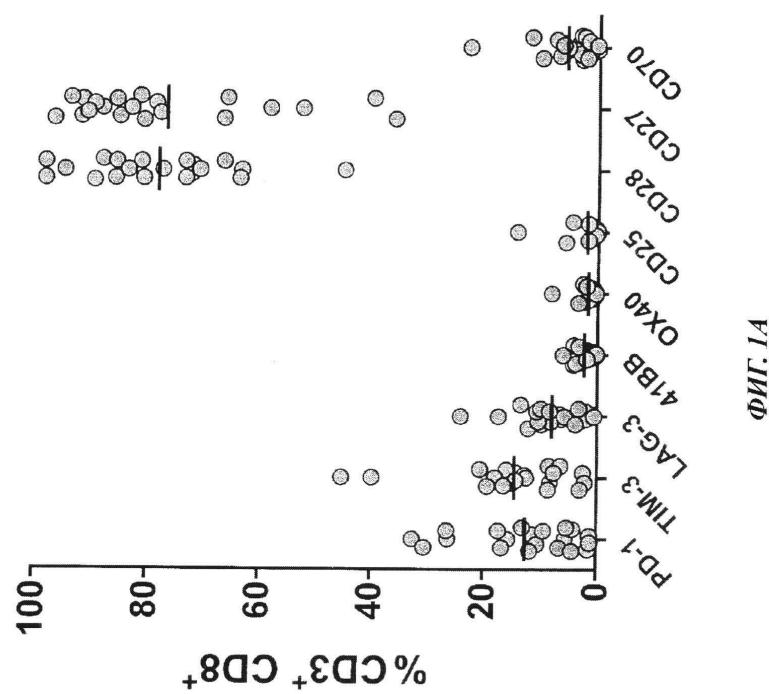
30

35

40

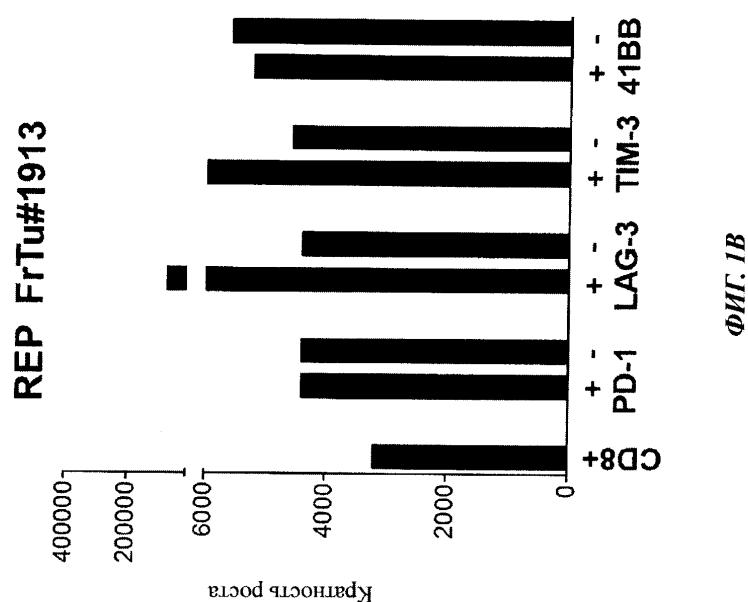
45

1

I

2

2



3

3

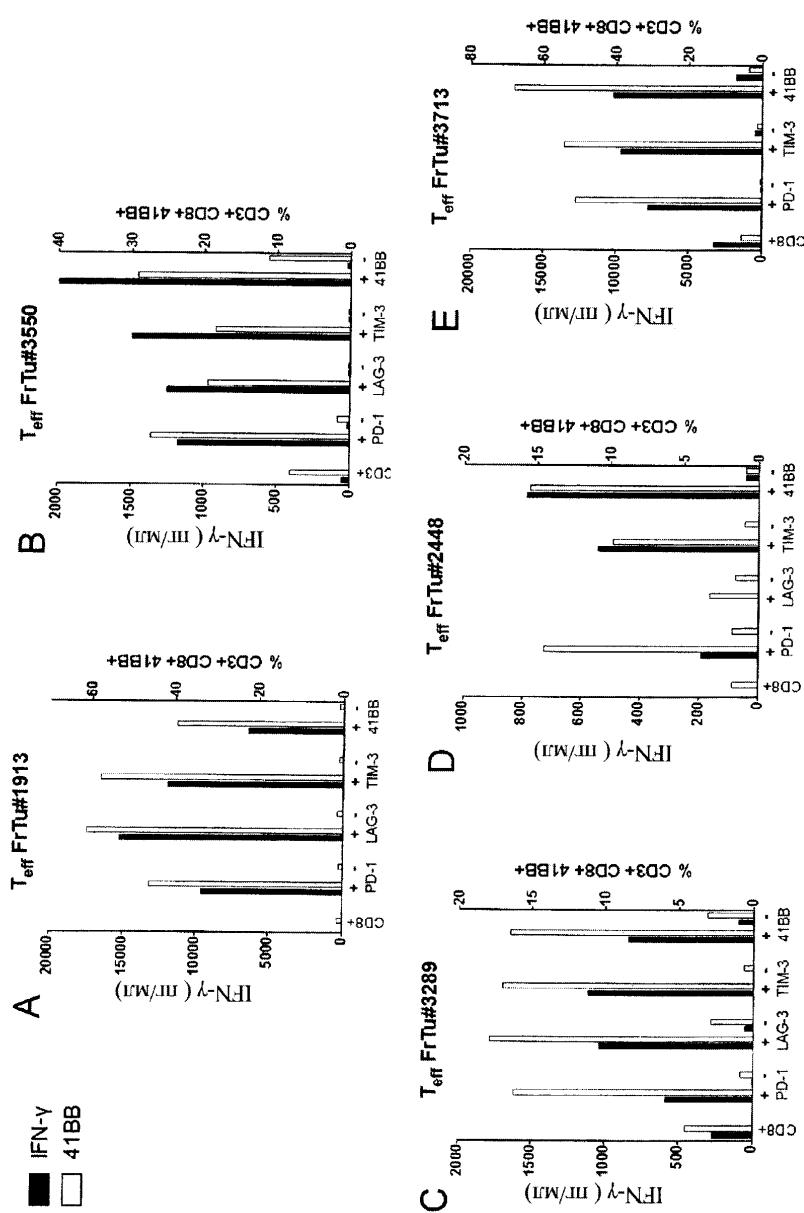
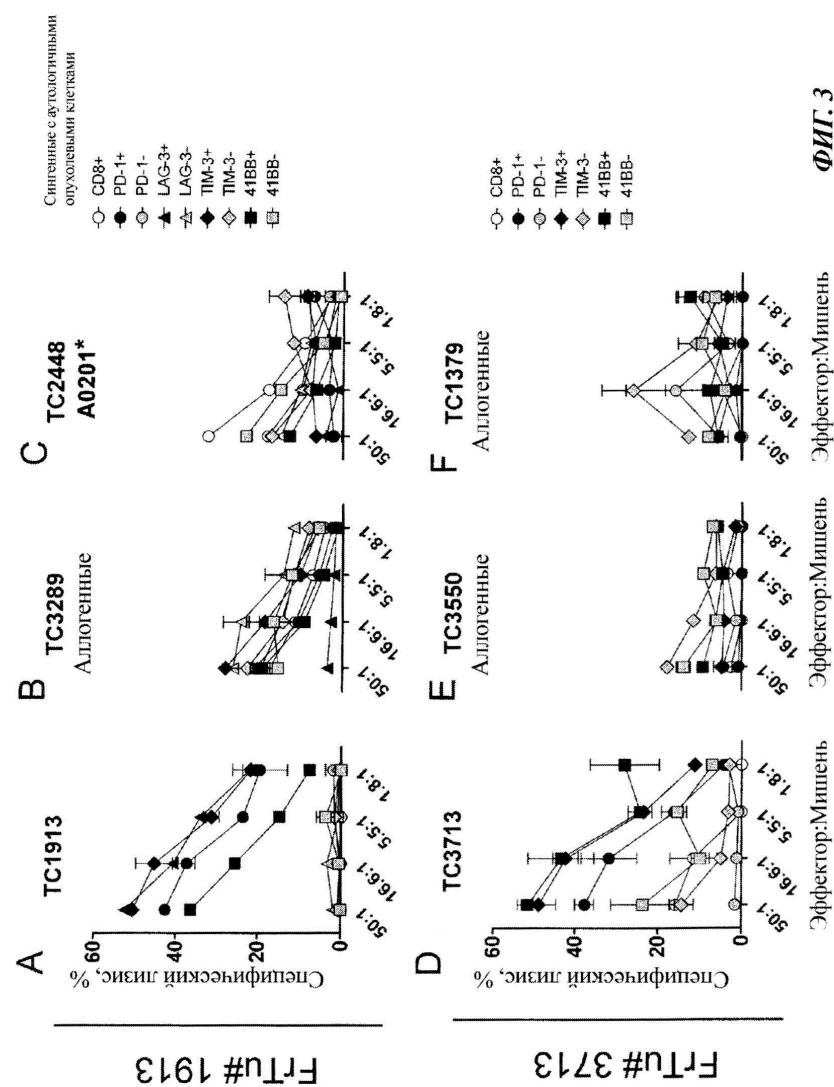
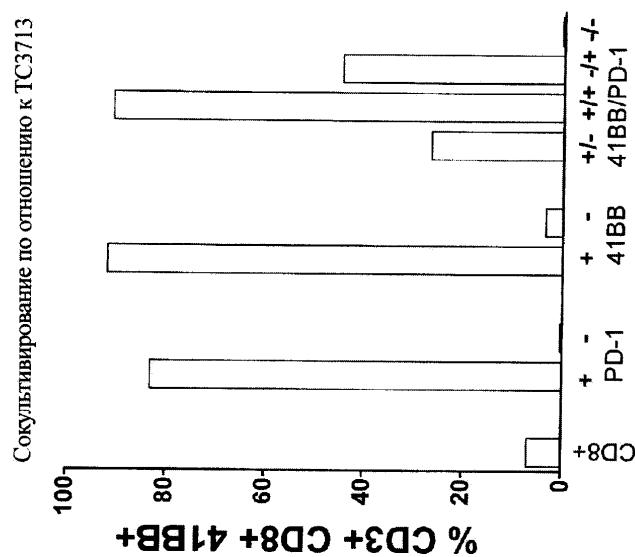
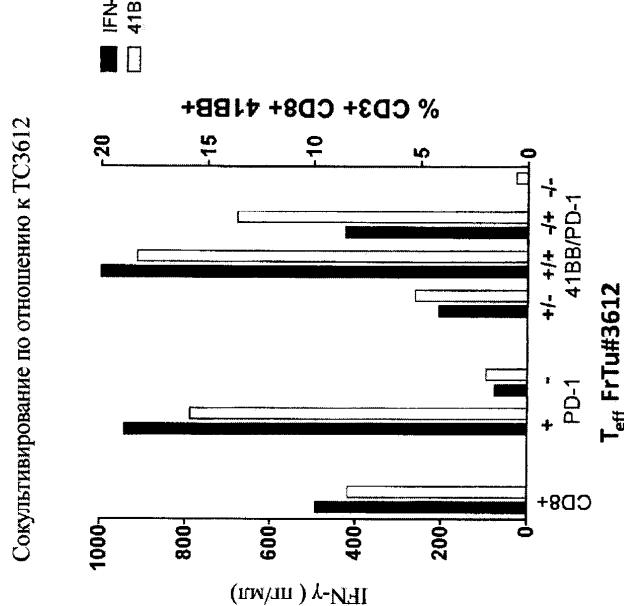


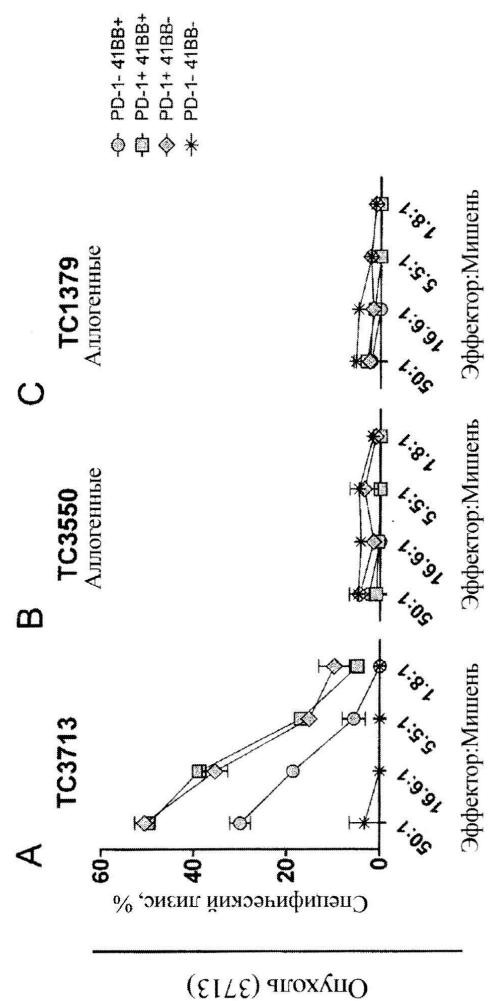
FIG. 2

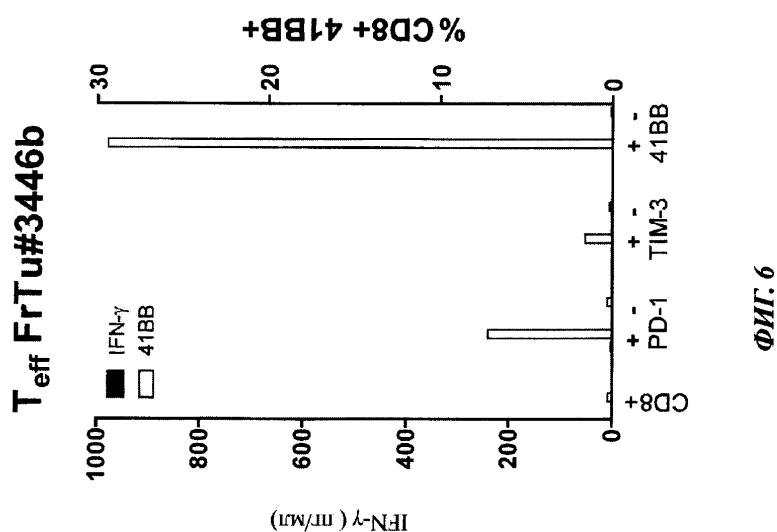




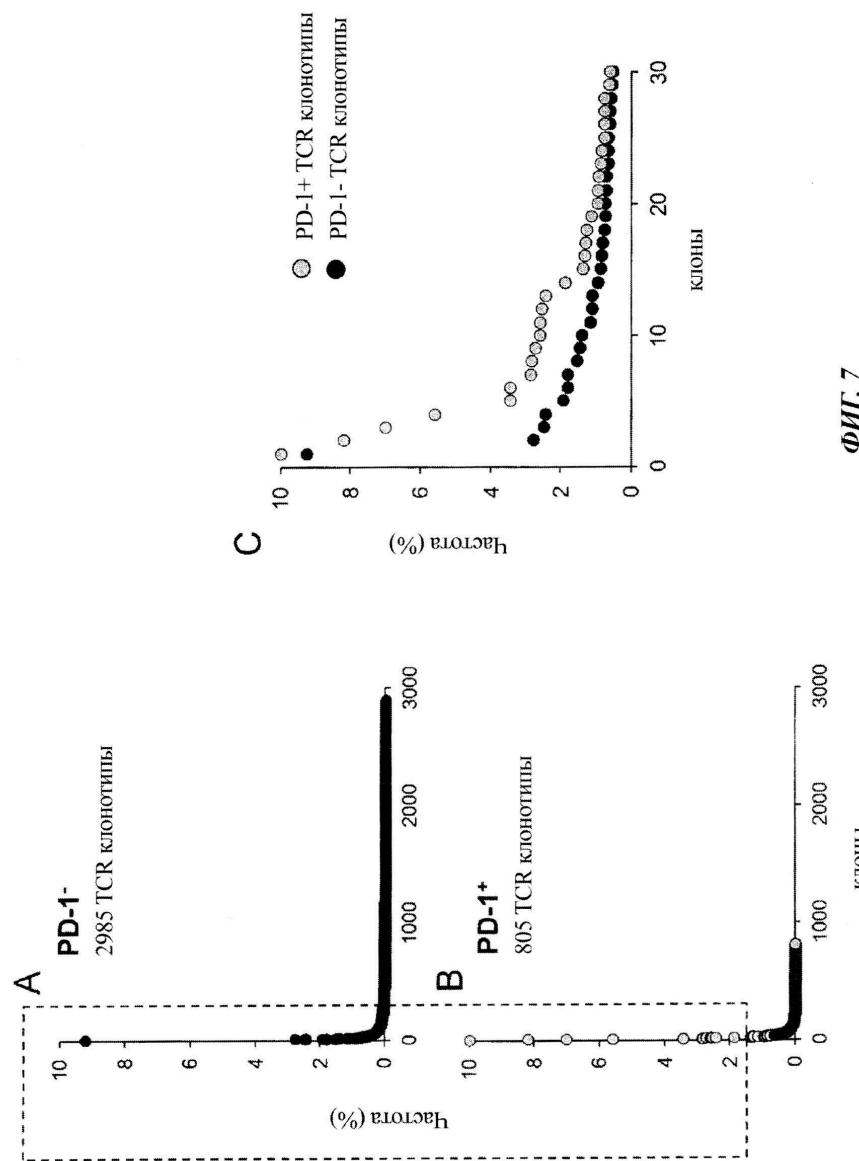
ФИГ. 4A

6**ФИГ. 4В**





9



ФИГ. 7

10