

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202393010 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.06.26

(22) Дата подачи заявки  
2022.04.27

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 31/337* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61P 35/04* (2006.01)  
*C07D 305/14* (2006.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*C12N 5/078* (2010.01)

(54) ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ

(31) 63/180,279

(32) 2021.04.27

(33) US

(86) PCT/CA2022/050636

(87) WO 2022/226641 2022.11.03

(71) Заявитель:

АЛЕТИА БАЙОТЕРАПЬЮТИКС  
ИНК. (CA)

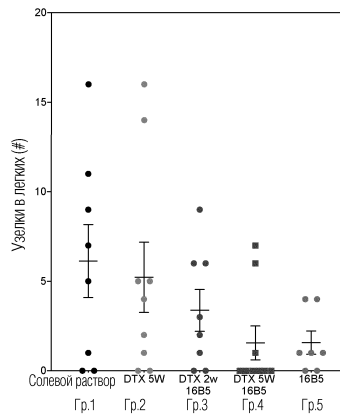
(72) Изобретатель:

Филион Марио (CA)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение в целом относится к способу лечения рака путем введения аутологичных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), выделенных от пациента, который ранее получал лечение противоопухолевой терапией, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент. Способ по настоящему изобретению включает введение пациенту противоопухолевой терапии, выделение TIL и реинфузию TIL пациенту. Настоящее изобретение также относится к применению антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в способе получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) *in vitro* или *ex vivo*.



202393010 A1

202393010 A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579636EA/042

### ТЕРАПИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ

#### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение в целом относится к способу лечения рака путем введения аутологичных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), выделенных от пациента, который ранее получал лечение противоопухолевой терапией, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент. Способ по настоящему изобретению включает введение пациенту противоопухолевой терапии, выделение ТИЛ и реинфузию ТИЛ пациенту. Настоящее изобретение также относится к применению антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в способе *in vitro* или *ex vivo* получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ).

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Иммуноклеточная терапия солидных опухолей состоит из двух разных подходов: адоптивного переноса встречающихся в природе опухолеспецифических Т-клеток, выделенных из опухолевых инфильтратов (ТИЛ), или переноса генетически модифицированных Т-лимфоцитов, которые экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор (tg-TCR), специфичный для опухолевого антигена, или химерный антигенный рецептор (CAR), состоящий из одноцепочечных вариабельных областей моноклонального антитела, слитых с эндодоменами сигнальных молекул Т-клеток.

Терапия ТИЛ имеет долгую историю развития и прошла многочисленные клинические испытания в центрах по всему миру, которые последовательно продемонстрировали длительный клинический ответ (~ 50%) при прогрессирующей меланоме и, в последнее время, при раке шейки матки.

Явным преимуществом лечения ТИЛ является широкий характер распознавания Т-клетками как определенных, так и неопределенных опухолевых антигенов, а также в контексте всех возможных молекул МНС, а не единственной специфичности tg-TCR- или CAR-трансдуцированных Т-клеток и ограниченного покрытия МНС tg-TCR-Т-клеток. Специфическая в отношении мишени внеопухолевая токсичность относительно нечаста при терапии ТИЛ, хотя это серьезная проблема, возникающая при терапии генетически модифицированными Т-клетками.

Таким образом, лечение рефрактерного рака с использованием адоптивного переноса ТИЛ представляет собой мощный подход к терапии пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, et al., *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 383-393. Нарращивание ТИЛ на основе IL-2 с последующим «процессом быстрого наращивания» (REP) стало предпочтительным методом наращивания ТИЛ благодаря его скорости и эффективности (Dudley, et al., *Science* 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., *Science* 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42). REP может привести к 1000-кратному

увеличению ТИЛ в течение 14-дневного периода, хотя для этого требуется большой избыток (например, в 200 раз) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС, также известных как мононуклеарные клетки (MNC)), часто от множества доноров, в качестве фидерных клеток, а также антитела против CD3 (ОКТ3) и высоких доз интерлейкина 2 (IL-2) (Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42). ТИЛ, прошедшие процедуру REP, показали успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой. Текущие параметры приемлемости инфузии зависят от показаний состава ТИЛ (например, положительность по CD28, CD8 или CD4), а также от кратного наращивания и жизнеспособности продукта REP.

Способы получения и наращивания ТИЛ описаны, например, без ограничений, в Jin J. et al., J Immunother. 35(3):283-292, 2012, в Dudley, M.E. et al., J Immunother. 26(4): 332-342, 2003 г., в международной заявке № PCT/US2018/01633 поданной 5 января 2018 и опубликованной 4 октября 2018 под №. WO2007/182817 и в международной заявке № PCT/US2019/052681 поданной 24 сентября 2019 г. и опубликованной 2 апреля 2020 г. под №. WO2020/068816, в международной заявке на патент №. PCT/US2015/025313 поданной 10 апреля 2015 г. и опубликованной 15 октября 2015 г. под №. WO2015/157636, в международной заявке № PCT/US2019/052681 поданной 24 сентября 2019 г. и опубликованной 2 апреля 2020 г. под №. WO2020/068816 (полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

К сожалению, некоторые пациенты являются носителями опухолей, которые плохо инфильтрируются иммунными клетками, и поэтому ожидается, что адоптивная клеточная терапия будет иметь ограниченную полезность.

Сохраняется необходимость увеличения присутствия ТИЛ в опухолях для модуляции противоопухолевого иммунного ответа *in vivo* и для адоптивной клеточной терапии.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Заявитель пришел к неожиданному открытию, что лечение антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом приводит к усилению внутриопухолевой иммунной инфильтрации (см. PCT/CA2021/050572, поданную 27 апреля 2021 г., и международную заявку на патент № PCT/CA2022/050632, поданную 26 апреля 2022 г., полное содержание каждой из которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

Предварительные данные клинического исследования фазы II, направленного на оценку комбинированного лечения, включающего антитело против кластерина (AB-16B5, также известное как гуманизированное 16B5) и доцетаксел, у пациентов с метастатическим немелкоклеточным раком легкого (NCT04364620), показывают аналогичную внутриопухолевую инфильтрацию иммунными клетками (см. PCT/CA2022/050632, поданную 26 апреля 2022 г.).

Таким образом, противоопухолевая терапия, включающая антитело против

кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, может быть введена пациенту, имеющему рак, для стимулирования инфильтрации иммунных клеток в микроокружение опухоли. Затем из опухолей подвергнутых лечению пациентов получают препараты инфильтрирующих опухоль лимфоцитов для использования в адоптивной клеточной терапии.

Настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, имеющего рак, причем способ включает стадию введения пациенту противоопухолевой терапии, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, стадию выделения и наращивания инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из опухоли пациента и стадию реинфузии препарата TIL пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение препарата TIL, раскрытого в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления препарат TIL состоит из одной или более культур TIL. В некоторых вариантах осуществления препарат TIL представляет собой культуру TIL.

В соответствии с настоящим изобретением противоопухолевая терапия состоит из антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, представленных в виде противоопухолевой монотерапии.

В соответствии с настоящим изобретением противоопухолевая терапия включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и другой противоопухолевый агент. Соответственно, противоопухолевая терапия может представлять собой комбинированную терапию.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и лучевую терапию.

В других вариантах осуществления комбинированная терапия включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапию.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с помощью инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), выделенных и размноженных из опухоли, выделенной от пациента, получающего противоопухолевую терапию, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления перед инфузией TIL пациент получает препаративную схему, истощающую лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления TIL выделяют и наращивают с помощью метода *in vitro* или *ex vivo* с получением инфильтрирующих опухоль лимфоцитов с целью получения препарата TIL. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование TIL.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию удаления опухолевых клеток из культуры TIL.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD45<sup>+</sup>клеток из культуры TIL.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора

CD3+клеток из культуры ТП.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD4+клеток из культуры ТП.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD8+клеток из культуры ТП.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора клеток, которые имеют уровень секреции INF $\gamma$  от среднего до высокого.

В некоторых вариантах осуществления ТП отбирают по их противоопухолевой активности *in vitro*.

Обычно ТП, обладающие противоопухолевой активностью, отбирают для использования в адоптивной клеточной терапии с использованием аутологичных клеток.

В некоторых вариантах осуществления ТП выделяют у пациента, которого подвергали или подвергают лечению противоопухолевой терапией, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления ТП выделяют у пациента, которого подвергали или подвергают лечению комбинированной терапией, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент.

Иллюстративные варианты осуществления химиотерапевтических агентов включают алкилирующий агент, антиметаболит, алкалоид, противоопухолевый антибиотик или их комбинацию.

В некоторых случаях алкилирующий агент может быть выбран, например, из алтретамина, бусульфана, карбоплатина, кармустина, цисплатина, циклофосфида, дакарбазина, ифосфида, ломустина, мелфалана, темозоломида, трабектедина или их производных или аналогов.

В некоторых случаях антиметаболит может быть выбран, например, из 5-фторурацила, 6-меркаптопурина, азациитидина, капецитабина, клофарабина, цитарабина, флоксуридина, флударабина, гемцитабина, метотрексата, пеметрекседа, пентостатина, пралатрексата, трифлуридина, типирацила или их производных или аналогов.

В некоторых случаях алкалоид может быть выбран, например, из винкристина, винбластина, винорелбина, таксанов, этопозида, тенипозида, иринотекана, топотекана или их производных или аналогов.

Иллюстративные варианты осуществления таксана включают доцетаксел, паклитаксел и производные или аналоги, включая, например, без ограничений, Абрахане®, кабазитаксел, ларотаксел, милатаксел, ортатаксел, тезетаксел и другие, описанные в Ojima et al., Expert Opin Ther Pat. 2016: 26(1): 1-20, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых случаях противоопухолевый антибиотик может быть выбран, например, из даунорубицина, доксорубицина, липосомного доксорубицина, эпирубицина, идарубицина, валрубицина, их производных или аналогов.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическим агентом является доцетаксел.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическим агентом является паклитаксел.

В некоторых вариантах осуществления опухоль является резектабельной.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет функциональную иммунную систему.

В некоторых вариантах осуществления ТП получают из опухоли или фрагментов опухоли, выделенных биопсией.

В некоторых вариантах осуществления ТП получают способом, который включает фазу начального культивирования и фазу наращивания.

В соответствии с настоящим изобретением способ получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов *in vitro* или *ex vivo* может включать стадию контакта фрагментов опухоли с антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент могут присутствовать и/или поддерживаться во время начальной фазы культивирования способа получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Альтернативно, в соответствии с настоящим изобретением, антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент могут присутствовать и/или поддерживаться во время фазы наращивания способа получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению может включать введение ТП, которые не являются генетически модифицированными. Однако можно генетически модифицировать ТП, чтобы заставить их экспрессировать или сверхэкспрессировать белки или пептиды.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП не является генетически модифицированным.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП включает генетически модифицированные ТП.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП включает ТП, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП включает ТП, которые экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП включает ТП, выделенные из первичной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП включает ТП, выделенные из метастаза.

В соответствии с настоящим изобретением ТП могут быть выделены у пациента, который ранее получил лечение противоопухолевой терапией, как описано в настоящем

документе.

В иллюстративном варианте осуществления пациент мог ранее получить лечение антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом и таксаном, таким как, например, доцетаксел или паклитаксел.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел можно вводить в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для обеспечения индуцированной химиотерапией иммуногенной модуляции опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением способ включает введение антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:10.

В соответствии с настоящим изобретением способ включает введение антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80% идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:10.

В соответствии с настоящим изобретением способ включает введение антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:12.

В соответствии с настоящим изобретением способ включает введение антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, для связывания кластерина.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят до выделения ТП. В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент вводят до выделения ТП. В некоторых вариантах

осуществления перед выделением ТП проводят один или более циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления противоопухолевая терапия, описанная в настоящем документе, также может применяться после адоптивной клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят после инфузии препарата ТП. В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент вводят после инфузии ТП. В некоторых вариантах осуществления после введения ТП проводят один или более циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг до выделения ТП или после инфузии ТП.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 6 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 9 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 12 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup> до выделения ТП или после инфузии ТП.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 12 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 12 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 9 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с



использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 9 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 6 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 6 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 3 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в дозе приблизительно 3 мг/кг один раз в неделю и доцетаксела в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел вводят в один и тот же день.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и/или доцетаксел вводят путем инфузии в течение приблизительно 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению предназначен для лечения пациента, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатическая карцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак эндометрия, рак молочной железы, рак печени, рак предстательной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак легких, рак желудка, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, холангиокарцинома, мезотелиома или меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак эндометрия, метастатический рак молочной железы, метастатический рак печени, метастатический рак предстательной железы, метастатический рак почки, метастатический рак мочевого пузыря, метастатический рак шейки матки, метастатический рак яичников, метастатический колоректальный рак, метастатический рак поджелудочной железы, метастатический рак легких, метастатический рак желудка,

метастатический рак головы и шеи, метастатический рак щитовидной железы, метастатическая холангиокарцинома, метастатическая мезотелиома или метастатическая меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента нет иммуносупрессии или он не получал иммуносупрессивное лекарственное средство в течение 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 дней или 1 дня до лечения с помощью антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент или до лечения с использованием комбинированной терапии антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом и доцетакселом.

В некоторых вариантах осуществления пациентом является человек.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, которая содержит CD4<sup>+</sup> Т-клетки.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, которая содержит CD8<sup>+</sup> Т-клетки.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, которая содержит В-клетки.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, которая содержит НК-клетки.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, которая содержит НК-Т-клетки.

Способ по настоящему изобретению может привести к получению препарата ТПЛ или культуры ТПЛ, обладающих противоопухолевой активностью.

Таким образом, настоящее изобретение относится к препарату инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТПЛ), полученных способом, описанным в настоящем документе.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает культуру инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТПЛ), полученную способом, описанным в настоящем документе.

Соответственно, настоящее изобретение также обеспечивает препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТПЛ), полученных способом лечения пациента, имеющего рак, с помощью противоопухолевой терапии, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ представляет собой препарат размноженных ТПЛ.

Настоящее изобретение также относится к культуре ТПЛ, полученной способом лечения пациента, имеющего рак, с помощью противоопухолевой терапии, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ или культуру ТПЛ получают от пациента, которого подвергали или подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в виде монотерапии или в составе комбинированной терапии с химиотерапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления ТПЛ не являются генетически

модифицированными.

В других вариантах осуществления ТПЛ генетически модифицированы.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ включает генетически модифицированные ТПЛ.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ включает ТПЛ, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ включает ТПЛ, которые экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ предоставляется в пакете для инфузии.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть CD45+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть CD3+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть CD4+ клеток.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть CD8+клеток.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть клеток, которые представляют собой CD4+клетки или CD8+клетки.

В некоторых случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать по меньшей мере 60% CD8+лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать по меньшей мере 70% CD8+лимфоцитов. В дополнительных случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать по меньшей мере 75% CD8+лимфоцитов. В дополнительных случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать более 75% CD8+лимфоцитов. Препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может секретировать INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В иллюстративном варианте осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может состоять из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов. В других иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может состоять из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В других иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов состоит из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 60% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на высоком уровне. В дополнительных иллюстративных вариантах

осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов состоит из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 70% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на высоком уровне. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов состоит из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 75% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на высоком уровне. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов состоит из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит более 75% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на высоком уровне.

В некоторых вариантах осуществления каждая из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может быть получена из одной и той же опухоли. В другом варианте осуществления каждую из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов можно получить из разных опухолей.

В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать менее 10% CD4+ лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать менее 7,5% CD4+ лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать менее 5% CD4+ лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может содержать 2% CD4+ лимфоцитов или менее.

Препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может представлять собой промышленное изделие. Примеры вариантов осуществления промышленного изделия включают флаконы, колбы, шприцы, пакеты для инфузий и т. п.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1: Метастазы 4T1 в легких являются иммунологически «холодными», что предотвращает инфильтрацию иммунных лимфоцитов. CD3+ и CD8+ Т-клетки присутствуют по краям метастазов 4T1 в легкие в результате создания рестриктивного микроокружения опухоли вследствие эпителиально-мезенхимальных переходов, что предотвращает лимфоцитарную инфильтрацию.

Фигура 2А: Ингибирование ЕМТ с помощью mAb против sCLU 16B5 приводит к инфильтрации лимфоцитов В (B220) и Т (CD3, CD4, CD8) при метастазах 4T1 в легкие.

Фигура 2В-Д: Изображение биопсии опухоли человека у пациентов, получавших АВ-16B5 в качестве монотерапии.

Фигура 3: График количества метастатических узелков в легких у животных с имплантатом 4T1, получавших АВ-16B5 в монотерапии или в комбинации с доцетакселом.

Фигура 4А и Фигура 4В: Метастазы 4T1 в легких у животных, получавших АВ-16B5 в монотерапии или в комбинации с доцетакселом, инфильтрированы В- и Т-лимфоцитами. Метастазы 4T1 в легких иссекали на 36-й день после имплантации и обрабатывали коллагеназой и гиалуронидазой для иммунофенотипирования с помощью

проточной цитометрии.

Дальнейший объем, применимость и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из неограничивающего подробного описания, приведенного ниже. Однако следует понимать, что это подробное описание, хотя и указывает иллюстративные варианты осуществления изобретения, дано только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые чертежи.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

### Определения

Если не указано иное, нумерация аминокислот, указанная для домена димеризации, соответствует системе нумерации EU.

Использование терминов в единственном числе в контексте описания вариантов осуществления (особенно в контексте формулы изобретения) следует истолковывать как охватывающее как единственное, так и множественное число, если здесь не указано иное или явно не противоречит контексту.

Если специально не указано и не очевидно из контекста, используемый в настоящем описании термин «или» понимается как включающий и охватывает как «или», так и «и».

Термин «и/или», используемый в настоящем описании, следует понимать как конкретное раскрытие каждого из указанных признаков или компонентов с другим или без него.

Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» следует истолковывать как открытые термины (т. е. означающие «включая, но не ограничиваясь»), если не указано иное. Термин «состоящий из» следует истолковывать как замкнутый.

Термин «лечение» для целей настоящего описания относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам. Те, кто нуждается в лечении, включают тех, у кого уже есть расстройство, а также тех, кто склонен иметь это расстройство, или тех, у кого расстройство должно быть предотвращено.

Термин «сигнатура EMT», используемый в настоящем описании, относится к изменениям, которые указывают на потерю эпителиального фенотипа и/или приобретение мезенхимального фенотипа, которые можно наблюдать на клеточном уровне и/или наблюдать или измерять на генетическом уровне или уровне белка.

Термин «примерно» или «приблизительно» в отношении данного значения означает, что предполагается изменение значения. В некоторых вариантах осуществления термин «примерно» или «приблизительно» обычно означает диапазон в пределах +/- 20 процентов, в пределах +/- 10 процентов, в пределах +/- 5 процентов, в пределах +/- 4 процентов, в пределах +/- 3 процента, в пределах +/- 2 процентов или в пределах +/- 1 процента от заданного значения или диапазона.

Термин «функциональная иммунная система» применительно к пациенту означает, что иммунная система пациента по существу не подвержена влиянию злокачественного

новообразования или лекарственного средства или что у пациента нет иммуносупрессии.

#### Методы и использования

Введение противоопухолевой терапии, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, способствует инфильтрации опухолевых клеток в микроокружение опухоли. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты выделяют из первичной опухоли или из метастазов опухоли и наращивают *in vitro*. Препараты инфильтрирующих опухоль лимфоцитов могут быть использованы в адоптивной клеточной терапии.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, имеющего рак, который включает стадию введения пациенту противоопухолевой терапии, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, стадию выделения и наращивания инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) из опухоли пациента и стадию реинфузии препарата TIL пациенту.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака с помощью инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), выделенных и размноженных из опухоли, выделенной от пациента, получающего противоопухолевую терапию, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент.

Таким образом, TIL можно выделить у пациента, который ранее получил лечение по меньшей мере антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом.

В некоторых случаях противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере за две недели до выделения TIL. В других случаях противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере за три недели до выделения TIL. В других случаях противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере за четыре недели до выделения TIL. В других случаях противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере за пять недель до выделения TIL. В других случаях противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере за шесть недель до выделения TIL.

В некоторых вариантах осуществления противоопухолевая терапия представляет собой комбинированную терапию, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел. Противоопухолевую терапию можно проводить в виде цикла лечения, который заключается во введении антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента еженедельно и доцетаксела один раз в три недели.

В иллюстративном варианте осуществления противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере в течение одного цикла лечения. В другом иллюстративном варианте осуществления противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере в течение двух циклов лечения. В еще одном иллюстративном варианте осуществления противоопухолевую терапию проводят в течение более чем двух циклов лечения.

Способ по настоящему изобретению может также включать стадию введения противоопухолевой терапии, которая включает антитело против кластерина или его

антигенсвязывающий фрагмент, после адоптивной клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления противоопухолевую терапию можно проводить по меньшей мере через неделю после адоптивной клеточной терапии. В другом варианте осуществления противоопухолевую терапию можно проводить по меньшей мере через две недели после адоптивной клеточной терапии. В еще одном варианте противоопухолевую терапию можно проводить по меньшей мере через три недели после адоптивной клеточной терапии. В дополнительных вариантах осуществления противоопухолевую терапию можно проводить по меньшей мере через четыре недели после адоптивной клеточной терапии.

В некоторых вариантах осуществления последующая противоопухолевая терапия представляет собой комбинированную терапию, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел. Последующую противоопухолевую терапию можно проводить в виде цикла лечения, который заключается во введении антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента один раз в неделю и доцетаксела один раз в три недели.

В иллюстративном варианте осуществления последующую противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере в течение одного цикла лечения. В другом иллюстративном варианте осуществления последующую противоопухолевую терапию проводят по меньшей мере в течение двух циклов лечения. В еще одном иллюстративном варианте осуществления последующую противоопухолевую терапию проводят в течение более двух циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления ТПЛ можно получить способом, известным специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления ТПЛ выделяют и наращивают с помощью метода *in vitro* или *ex vivo* с получением инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

ТПЛ обычно обрабатывают методом, который включает начальную фазу культивирования и фазу наращивания.

Начальную фазу культивирования можно проводить путем помещения опухолевых гидролизатов и/или опухолевых фрагментов в культуру, обычно в 24-луночные планшеты. В начальной фазе культивирования ТПЛ могут быть суспензионной культурой в среде для культивирования клеток, а опухолевые клетки могут быть в виде культуры, прикрепленной к планшету для культивирования.

Фрагменты опухоли могут происходить из первичной опухоли или из метастазов опухоли, полученных от пациента, получающего противоопухолевую терапию, описанную в настоящем документе.

Начальная фаза культивирования включает культивирование ТПЛ в присутствии опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент культивируют отдельно для получения отдельных культур ТПЛ.

На начальной фазе культивирования культура ТПЛ может быть снабжена цитокинами. Иллюстративные варианты осуществления цитокинов включают IL-2

(рекомбинантный человеческий IL-2), IL-7 (рекомбинантный человеческий IL-7), IL-15 (рекомбинантный человеческий IL-15) и их комбинацию.

Начальную фазу культивирования обычно проводят в течение периода от двух до пяти недель. В некоторых случаях начальную фазу культивирования проводят в течение по меньшей мере двух недель. В других случаях начальную фазу культивирования проводят в течение по меньшей мере трех недель. В других случаях начальную фазу культивирования проводят в течение по меньшей мере четырех недель. В других случаях начальную фазу культивирования проводят в течение более чем четырех недель.

Каждую культуру ТИЛ можно тестировать во время или в конце начальной фазы культивирования, чтобы идентифицировать культуры, обладающие желательной противоопухолевой активностью. Альтернативно, каждая культура ТИЛ может быть протестирована во время или в конце начальной фазы культивирования, чтобы идентифицировать культуры, имеющие наибольшую долю лимфоцитов. В некоторых случаях Т-лимфоциты можно идентифицировать с помощью цитометрии с использованием таких маркеров, как, например, без ограничений, CD3, CD45 или их комбинация. В некоторых случаях может быть выбрана культура ТИЛ, имеющая наибольшую долю цитотоксических лимфоцитов.

Противоопухолевую активность данной культуры ТИЛ можно оценить, например, по уровню  $INF\gamma$ , секретируемого в присутствии опухолевых клеток. Более конкретно, увеличение секреции  $INF\gamma$  в присутствии опухолевых клеток по сравнению с исходной секрецией  $INF\gamma$  может указывать на потенциальную противоопухолевую активность данной культуры ТИЛ. В других случаях противоопухолевую активность данной культуры ТИЛ можно определить по экспрессии маркеров активации. Иллюстративным вариантом осуществления маркера активации является CD37. Экспрессию маркеров активации можно определить, например, с помощью цитометрии. Могут быть использованы другие методы тестирования противоопухолевой активности.

ТИЛ, которые проявляют противоопухолевую активность, в частности, рассматриваются для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления для фазы наращивания могут быть выбраны культуры ТИЛ, демонстрирующие признаки секреции  $INF\gamma$  или увеличение секреции  $INF\gamma$  при совместном культивировании с опухолевыми клетками по сравнению с исходным уровнем.

В иллюстративных вариантах осуществления уровень секреции  $INF\gamma$ , равный или превышающий 100 пг/мл, в частности, рассматривается для отбора на фазу наращивания.

В других иллюстративных вариантах осуществления уровень секреции  $INF\gamma$ , равный или превышающий 300 пг/мл (средний уровень), в частности, рассматривается для отбора на фазу наращивания.

В других иллюстративных вариантах осуществления уровень секреции  $INF\gamma$ , равный или превышающий 500 пг/мл (высокий уровень), в частности, рассматривается для отбора на фазу наращивания.



В некоторых вариантах осуществления секретию  $INF\gamma$  определяют после по меньшей мере двух недель культивирования. В других вариантах осуществления секретию  $INF\gamma$  определяют после по меньшей мере трех недель культивирования. В других вариантах осуществления секретию  $INF\gamma$  определяют после по меньшей мере четырех недель культивирования.

В некоторых вариантах осуществления культура ТПЛ, которая имеет наибольшую долю цитотоксических Т-клеток, может быть отобрана для фазы наращивания или для введения пациенту. Например, отбирают культуры ТПЛ, имеющие наибольшую долю  $CD8+$  Т-лимфоцитов. В другом примере отбирают культуры ТПЛ, содержащие по меньшей мере 50%  $CD8+$  Т-лимфоцитов.

Культуру ТПЛ, имеющую желаемые характеристики, можно объединить до или после фазы наращивания или, альтернативно, можно нарастить индивидуальную культуру ТПЛ.

В некоторых вариантах осуществления фаза наращивания может включать удаление опухолевых клеток из культуры ТПЛ или выделение иммунных клеток из культуры. В некоторых случаях  $CD8+$  Т-клетки могут быть отобраны из культуры для последующего переноса пациенту.

Для фазы наращивания, если желательно, культура ТПЛ также может быть снабжена цитокинами. Иллюстративные варианты осуществления цитокинов включают  $IL-2$  (рекомбинантный человеческий  $IL-2$ ),  $IL-7$  (рекомбинантный человеческий  $IL-7$ ),  $IL-15$  (рекомбинантный человеческий  $IL-15$ ) и их комбинацию. При желании один или более цитокинов можно исключить из фазы наращивания.

Фазу наращивания обычно проводят в течение периода от одной до пяти недель. В некоторых случаях фаза наращивания может проводиться по меньшей мере в течение одной недели. В других случаях фаза наращивания может проводиться в течение по меньшей мере двух недель. В других случаях фаза наращивания может проводиться в течение по меньшей мере трех недель. В других случаях фаза наращивания может проводиться в течение по меньшей мере четырех недель.

Препарат ТПЛ можно дополнительно проверить на противоопухолевую активность.

Способ по настоящему изобретению может включать стадию обработки культуры ТПЛ или препарата ТПЛ с целью улучшения их характеристик. Обработку можно проводить в один или более моментов времени на протяжении начальной фазы культивирования или на протяжении фазы наращивания.

Например, культуру ТПЛ или препарат ТПЛ можно обработать для удаления компонентов, которые могут оказывать негативное влияние на противоопухолевую активность. В другом примере культуру ТПЛ или препарат ТПЛ можно обработать для удаления компонентов, которые могут препятствовать росту или активности цитотоксических лимфоцитов.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления культуру ТПЛ или препарат ТПЛ можно обрабатывать для удаления TReg.

В других иллюстративных вариантах осуществления культуру ТИЛ или препарат ТИЛ можно обрабатывать для удаления НКТ-клеток.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию удаления опухолевых клеток из культуры ТИЛ или препарата ТИЛ.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD45+ клеток из культуры ТИЛ или препарата ТИЛ.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD4+клеток из культуры ТИЛ или препарата ТИЛ.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора CD8+клеток из культуры ТИЛ или препарата ТИЛ.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые секретируют INF $\gamma$  на уровне, равном или превышающем 100 пг/мл.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые секретируют INF $\gamma$  на уровне, равном или превышающем 300 пг/мл (средний уровень).

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые секретируют INF $\gamma$  на уровне, равном или превышающем 500 пг/мл (высокий уровень).

В других вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов. В других вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по меньшей мере 60% CD8+лимфоцитов. В других вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по меньшей мере 70% CD8+лимфоцитов. В дополнительных вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по меньшей мере 75% CD8+лимфоцитов. В дополнительных вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат более 75% CD8+лимфоцитов.

В дополнительных вариантах осуществления способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат CD8+ лимфоциты и которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

Соответственно, в некоторых случаях способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов и которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В других случаях способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов ТИЛ, которые содержат по

меньшей мере 60% CD8+лимфоцитов и которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В других случаях способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов TIL, которые содержат по меньшей мере 70% CD8+лимфоцитов и секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В дополнительных случаях способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов TIL, которые содержат по меньшей мере 75% CD8+лимфоцитов и которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В дополнительных случаях способ может включать стадию отбора культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов TIL, которые содержат более 75% CD8+лимфоцитов и секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или препаратов TIL, которые содержат CD8+ лимфоциты и которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В других иллюстративных вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 60% CD8+лимфоцитов и секретирует INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 70% CD8+лимфоцитов и INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 75% CD8+лимфоцитов и INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого. В других иллюстративных вариантах осуществления способ может включать стадию объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит более 75% CD8+лимфоцитов и INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В иллюстративном варианте осуществления способ может включать стадию отбора и/или объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, которые секретируют INF $\gamma$  на среднем уровне.

В иллюстративном варианте осуществления способ может включать стадию отбора и/или объединения культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, которые секретируют INF $\gamma$  на высоком уровне.

Аналогичным образом можно объединить препараты TIL, имеющие различные характеристики.

В некоторых вариантах осуществления препарат TIL получают от пациента, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТПЛ получают от пациента, которого подвергали или подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в качестве монотерапии.

В некоторых вариантах осуществления ТПЛ получают от пациента, которого подвергали или подвергают лечению комбинированной терапией, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент.

В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическим агентом является доцетаксел.

В некоторых вариантах осуществления опухоль является резектабельной.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет функциональную иммунную систему.

В некоторых вариантах осуществления ТПЛ получают из опухоли или фрагментов опухоли, выделенных биопсией.

В соответствии с настоящим изобретением способ получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов *in vitro* или *ex vivo* включает стадию контакта фрагментов опухоли с антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент могут присутствовать и/или поддерживаться во время начальной фазы культивирования способа получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

В соответствии с настоящим изобретением, антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент могут присутствовать и/или поддерживаться во время фазы наращивания способа получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

ТПЛ могут быть генетически модифицированы или нет. Например, ТПЛ могут экспрессировать химерный антигенный рецептор. Основная структура химерных антигенных рецепторов описана в литературе (например, Gacerez, A.T. et al., *J Cell Physiol.* 231(12):2590-2598 (2016), Sadelain, M. et al. *Cancer Discovery*, 3(4):388-98, (2013), Zhang, C. et al., *Biomarker Research*, 5:22 (2017)). Химерный антигенный рецептор обычно содержит внеклеточный антигенсвязывающий домен, обычно в форме одноцепочечного Fv, трансмембранный домен, костимулирующий домен и внутриклеточный сигнальный домен.

В других примерах ТПЛ могут экспрессировать трансгенный Т-клеточный рецептор.

ТПЛ можно выделить из первичной опухоли или из метастаза опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел можно вводить в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для обеспечения

индуцированной химиотерапией иммуногенной модуляции опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент описаны в настоящем документе. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой гуманизированное 16B5.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят до выделения ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент вводят до выделения ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления перед выделением ТИЛ проводят один или более циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят после инфузии ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент вводят после инфузии ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления после введения ТИЛ проводят один или более циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает CD3+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает CD4+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает CD8+ Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает В-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает НК-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ включает НК-Т-клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ выбирают для распознавания опухолевого антигена.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент можно вводить в дозировке, по схеме и/или по графику, раскрытым в настоящем описании.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел можно вводить в дозировке, по схеме и/или по графику, раскрытым в настоящем описании.

В соответствии с настоящим изобретением комбинацию антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента и доцетаксела можно вводить в дозировке, по схеме и/или по графику, раскрытым в настоящем описании.

В соответствии с настоящим изобретением у пациента может быть карцинома, такая как, например, метастатическая карцинома.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения пациента, имеющего рак, который включает введение инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), полученных способом *in vitro* или *ex vivo*, включающий стадию контакта фрагментов опухоли с антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в виде монотерапии или в составе комбинированной терапии с химиотерапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления пациент мог ранее получать лечение в виде

антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента или комбинированной терапией.

В некоторых вариантах осуществления пациент ранее не получал лечения в виде антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента или комбинированной терапией.

В соответствии с настоящим изобретением пациенту повторно вводят ТП. Протоколы инфузии ТП описаны в литературе. В некоторых вариантах осуществления перед инфузией ТП пациент получает препаративную схему, истощающую лимфоциты. В некоторых вариантах осуществления пациент получает ИЛ-2.

Например, перед инфузией препарата ТП пациенты могут получать немиелоаблативную препаративную схему, истощающую лимфоциты, состоящую из циклофосфида (60 мг/кг/день x 2 дня внутривенно) и флударабина (25 мг/м<sup>2</sup>/день x 5 дней внутривенно). За внутривенным адоптивным переносом ТП может последовать внутривенное введение ИЛ-2 (пролейкин) (600000 МЕ/кг/доза каждые 8 часов до достижения переносимости или до 15 доз).

#### Препарат ТП и культура ТП

Настоящее изобретение также относится к препарату инфилтрирующих опухоль лимфоцитов (ТП), полученному способом, описанным в настоящем документе.

Настоящее изобретение также относится к культуре ТП, полученной способом, описанным в настоящем документе.

Выражения «препарат ТП» и «ТП-препарат» используются взаимозаменяемо.

Обычно выражение «препарат ТП» используется для обозначения композиции для введения при адоптивной клеточной терапии. Выражение «культура ТП» обычно относится к композиции, которую выделили, нарастили или которая находится в процессе выделения и/или наращивания. «Культура ТП» может происходить из одного клона клеток или из смешанной популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления препарат ТП может состоять из одной культуры ТП или из нескольких культур ТП.

Следует понимать, что «препарат ТП» и «культура ТП» могут иметь сходные или идентичные характеристики. В некоторых вариантах осуществления препарат ТП представляет собой культуру ТП.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП или культуру ТП получают от пациента, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП представляет собой препарат размноженных ТП.

Соответственно, настоящее изобретение также относится к препарату размноженных инфилтрирующих опухоль лимфоцитов (ТП) или культуры ТП, полученных способом лечения пациента, имеющего рак, с помощью антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделения и наращивания инфилтрирующих опухоль лимфоцитов (ТП) из опухоли пациента.

В некоторых вариантах осуществления препарат ТП или культуру ТП получают

от пациента, которого подвергали или подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в виде монотерапии или в составе комбинированной терапии с химиотерапевтическим агентом.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ не являются генетически модифицированными.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ генетически модифицированы.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ экспрессируют химерный антигенный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор.

В некоторых вариантах осуществления ТИЛ предоставляются в пакете для инфузии.

Препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ может секретировать  $INF\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ секретирует  $INF\gamma$  на уровне, равном или превышающем 100 пг/мл.

В других иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ секретирует  $INF\gamma$  на уровне, равном или превышающем 300 пг/мл (средний уровень).

В других иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ секретирует  $INF\gamma$  на уровне, равном или превышающем 500 пг/мл (высокий уровень).

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) или культура ТИЛ содержит большую часть CD45+ клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 80% CD45+клеток. Например, в других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 90% CD45+клеток. В других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 95% CD45+клеток. Тем не менее, в других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 99% CD45+ клеток. В других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать только CD45+клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) содержит большую часть CD4+ клеток. Например, в некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать более 50% CD4+ клеток. В других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 60% CD4+клеток. В других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 70% CD4+клеток. В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может содержать по меньшей мере 80% CD4+клеток. В дополнительных вариантах осуществления препарат

ТІЛ или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 90% CD4+клеток. В других вариантах осуществления препарат ТІЛ или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 95% CD4+клеток. Тем не менее, в других вариантах осуществления препарат ТІЛ или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 99% CD4+клеток. В других вариантах осуществления препарат ТІЛ или культура ТІЛ может содержать только CD4+клетки.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТІЛ) или культура ТІЛ содержит большую часть CD8+клеток. В некоторых случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов. Например, в некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать более 50% CD8+клеток. В других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 60% CD8+клеток. В других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 70% CD8+клеток. В других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 75% CD8+клеток. В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 80% CD8+клеток. В дополнительных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 90% CD8+клеток. В других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 95% CD8+клеток. Тем не менее, в других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать по меньшей мере 99% CD8+клеток. В других вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать только CD8+клетки. В некоторых случаях CD8+клетки представляют собой CD8+ Т-лимфоциты.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТІЛ может содержать CD8+ лимфоциты и может секретировать INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В некоторых вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может состоять из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит CD8+ лимфоциты и секретирует INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

В иллюстративном варианте осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может состоять из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых содержит по меньшей мере 50% CD8+лимфоцитов. В других иллюстративных вариантах осуществления препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов может состоять из культур инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, каждая из которых





мере 99% клеток, которые являются CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>. В других вариантах осуществления препарат ТИЛ или культура ТИЛ может включать только клетки, которые являются CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup>.

В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ может содержать менее 10% CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ может содержать менее 7,5% CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ может содержать менее 5% CD4<sup>+</sup> лимфоцитов. В других случаях препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов или культура ТИЛ может содержать 2% CD4<sup>+</sup> лимфоцитов или менее.

В иллюстративных вариантах осуществления препарат ТИЛ или культуры ТИЛ характеризуется уровнем секреции INF $\gamma$ , равным или превышающим 100 пг/мл.

В другом иллюстративном варианте осуществления препарат ТИЛ или культуры ТИЛ характеризуется уровнем секреции INF $\gamma$ , равным или превышающим 300 пг/мл (средний уровень).

В еще одном иллюстративном варианте осуществления препарат ТИЛ или культуры ТИЛ характеризуется уровнем секреции INF $\gamma$ , равным или превышающим 500 пг/мл (высокий уровень).

В некоторых вариантах осуществления препарат ТИЛ, раскрытый в настоящем описании, вводят пациенту. Препарат ТИЛ является аутологичным по отношению к пациенту, от которого он был первоначально выделен.

В способе по настоящему изобретению препарат ТИЛ вводят пациенту. Обычно для лечения пациента используют от 10<sup>8</sup> до 10<sup>11</sup> клеток. Пациент может получить лечение, истощающее лимфоциты, до адоптивной клеточной терапии.

Пациент также может получать высокие дозы ИЛ-2. Иллюстративные варианты осуществления высокой дозы ИЛ-2 включают 600000 МЕ/кг или 720000 МЕ/кг. Высокая доза ИЛ-2 может обеспечиваться внутривенно каждые 8 часов. Высокую дозу ИЛ-2 может обеспечиваться до 15 последовательных доз. Последовательные дозы могут обеспечиваться, например, в течение 5 дней.

Антитела против кластерина или их антигенсвязывающие фрагменты

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способно ингибировать эпителиально-мезенхимальный переход.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способно связываться с аминокислотами 421 и 443 С-концевой части  $\beta$ -субъединицы человеческого кластерина (SEQ ID NO: 41, см. PCT /CA2006/001505, опубликованный под №. WO2007/030930 и международную заявку № PCT/CA2010/0001882, опубликованную под № WO2011/063523, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению способно связываться с эпитопом, содержащимся в аминокислотах 421 и 443 С-концевой части  $\beta$ -субъединицы кластерина человека (SEQ ID NO:41, см. PCT/CA2006/001505, опубликованный под № WO2007/030930 и международную заявку № PCT/CA2010/0001882, опубликованную под № WO2011/063523, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое способно конкурировать с антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению за связывание кластерина (например, секретлируемый кластерин (sCLU) или опухолеассоциированный sCLU (TA-sCLU)) или за связывания с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:41.

В некоторых вариантах осуществления CDR идентифицируют с использованием способов, известных специалисту в данной области и которые рассмотрены в *Antibody Engineering Vol. 2, Chapter 3 by Andrew C.R. Martin*, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

В конкретных вариантах осуществления все CDR идентифицируют с использованием определения Kabat, которое является наиболее часто используемым определением (Wu and Kabat, 1970).

В конкретных вариантах осуществления все CDR идентифицируют с использованием определения на основе контактных областей (MacCallum et al., 1996), которое, вероятно, будет наиболее полезным для людей, желающих провести мутагенез для изменения аффинности антитела, поскольку это остатки, которые принимают участие во взаимодействиях с антигеном.

В конкретных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:10.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:1, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:2, CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3.



аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:8.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:7, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, за связывание кластерина (например, секретируемого кластерина (sCLU) или опухлеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:41.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:10.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его

антигенсвязывающий фрагмент способны конкурировать с антителом, содержащим переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, за связывание кластерина (например, секретируемого кластерина (sCLU) или опухлеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:12, за связывание кластерина (например, секретируемого кластерина (sCLU) или опухлеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:41.

В других конкретных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:15, CDRL2, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:16, CDRL3, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:17.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, имеющую аминокислотную последовательность,



область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:21, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:22.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:21, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:22, за связывание кластерина (например, секретлируемого кластерина (sCLU) или опухолеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:23, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:23, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:23, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:24.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность,



представленную в SEQ ID NO:23, и вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислоту последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, за связывание кластерина (например, секретлируемого кластерина (sCLU) или опухолеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:41.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:26.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:25, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:26, за связывание кластерина (например, секретлируемого кластерина (sCLU) или опухолеассоциированного sCLU (TA-sCLU)) или за связывание с полипептидом, содержащим аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:41.

В других конкретных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR, вариабельные области или полноразмерные аминокислотные последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, перечисленные в Таблице 5. Аминокислотная последовательность антител, идентифицированная как 16B5, 21B12, 20E11, 11E2 и 16C11, раскрыта в международной заявке № PCT/CA2006/001505, поданной 13 сентября 2006 г. и опубликованной 22 марта 2007 г. под №. WO2007/030930, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки. Аминокислотная последовательность мышинового 16B5, гуманизированного 16B5, мышинового 21B12 и гуманизированного 21B12 раскрыта в международной заявке № PCT/CA2010/001882, поданной 24 ноября 2010 г. и опубликованной 3 июня 2011 г. под №. WO2011/063523,

полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

В дополнительных конкретных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент может быть способно конкурировать с одним или более антителами или их антигенсвязывающими фрагментами, перечисленными в Таблице 5.

Пациент

В некоторых аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения пациентом является человек.

В некоторых аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения пациентом является пациент, имеющий рак.

В других аспектах и вариантах осуществления настоящего изобретения пациентом является пациент, имеющий рак и имеющий функциональную иммунную систему.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак эндометрия, рак молочной железы, рак печени, рак предстательной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак легких, рак желудка, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, холангиокарцинома, мезотелиома или меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатическая карцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак эндометрия, метастатический рак молочной железы, метастатически рак печени, метастатический рак предстательной железы, метастатический рак почки, метастатический рак мочевого пузыря, метастатический рак шейки матки, метастатический рак яичников, метастатический колоректальный рак, метастатический рак поджелудочной железы, метастатический рак легких, метастатический рак желудка, метастатический рак головы и шеи, метастатический рак щитовидной железы, метастатическая холангиокарцинома, метастатическая мезотелиома или метастатическая меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический NSCLC.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется NSCLC от III до IV стадии.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак молочной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак желудка.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак головы и шеи.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак яичников.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак яичников.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак печени.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак печени.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический колоректальный рак.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатический рак поджелудочной железы.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатическая холангиокарцинома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется мезотелиома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатическая мезотелиома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется метастатическая меланома.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется опухоль, или он выбран на основании наличия опухоли, характеризующейся как иммунологически холодная.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется опухоль, или он выбран

на основании наличия опухоли, характеризующейся как иммунологически теплая или горячая, которая не реагирует на иммунотерапию.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется опухоль, или он выбран на основании наличия опухоли, демонстрирующей признаки эпителиально-мезенхимального перехода (EMT).

Используемый в настоящем описании термин «опухоль» относится к первичной опухоли или к опухолевым метастазам или поражениям.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия карциномы, которая прогрессировала после терапии первой линии с использованием иммунных контрольных точек.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия у него карциномы, предшествующее лечение которой терапией с использованием иммунных контрольных точек и платиносодержащим дуплетом оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия у него карциномы, предшествующее лечение которой терапией с использованием иммунных контрольных точек и платиносодержащим дуплетом, вводимых одновременно или последовательно, оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия у него карциномы, предшествующее лечение которой антителом против иммунной контрольной точки PD1 или PDL-1 и с использованием платиносодержащего дуплета оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия у него карциномы, предшествующее лечение которой ипилиумабом, ниволумабом, пембролизумабом, цемиплимабом, атезолизумабом, авелумабом или дурвалумабом и платиносодержащим дуплетом оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется карцинома, или он выбран на основании наличия у него карциномы, предшествующее лечение которой с использованием антитела против иммунной контрольной точки PD1 или PDL-1 и с использованием платиносодержащего дуплета, вводимых одновременно или последовательно, оказалось неэффективным.

В некоторых вариантах осуществления у пациента нет иммуносупрессии.

В некоторых вариантах осуществления пациент не получал иммуносупрессивное лекарственное средство в течение 14 дней, 7 дней, 6 дней, 5 дней, 4 дней, 3 дней, 2 дней или 1 дня до лечения. В некоторых вариантах осуществления пациент мог получать кортикостероиды до лечения.

В некоторых вариантах осуществления пациент ранее не получал лечения доцетакселом.

В некоторых вариантах осуществления пациента подвергают лечению по меньшей

мере в течение двух циклов лечения.

В некоторых вариантах осуществления перед инфузией ТПЛ пациент получает препаративную схему, истощающую лимфоциты.

Дозировки, схемы и графики лечения

В соответствии с аспектом настоящего изобретения пациента подвергают лечению противоопухолевой терапией, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, перед выделением инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Соответственно, антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе, достаточной для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления доза антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента представляет собой терапевтически эффективную и безопасную дозу.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят с интервалом введения, достаточным для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в течение периода лечения, достаточного для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе, с интервалом введения и/или периодом лечения, достаточными для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения пациента подвергают лечению комбинированной терапией, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел, перед выделением инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

В некоторых вариантах осуществления доза доцетаксела представляет собой терапевтически эффективную и безопасную дозу.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят с интервалом введения, достаточным для обеспечения иммуногенной модуляции опухоли, вызванной химиотерапией.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в течение периода лечения, достаточного для обеспечения иммуногенной модуляции опухоли, вызванной химиотерапией.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для обеспечения иммуногенной модуляции опухоли, вызванной химиотерапией.

Соответственно, антитело против кластерина или его антигенсвязывающий

фрагмент и доцетаксел вводят в дозе, достаточной для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружении опухоли и/или обеспечить индуцированную химиотерапией иммуногенную модуляцию опухоли.

В соответствии с еще одним аспектом настоящего изобретения пациента подвергают лечению противоопухолевой терапией, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент после реинфузии инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

В соответствии с дополнительным аспектом настоящего изобретения пациента подвергают лечению комбинированной терапией, включающей антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел после реинфузии инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят один раз в неделю.

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят два раза в неделю.

В соответствии с еще одним иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят три раза в неделю.

В соответствии с дополнительным иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят один раз в две недели.

В соответствии с еще одним иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят один раз в три недели.

В соответствии с дополнительным иллюстративным вариантом осуществления изобретения антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно в течение периода по меньшей мере двух недель до выделения ТП. В других вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно в течение периода по меньшей мере трех недель до выделения ТП. В других вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно в течение периода по меньшей мере четырех недель до выделения ТП. В дополнительных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно в течение периода по меньшей мере пяти недель до выделения ТП. В дополнительных вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят еженедельно в течение периода по









антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе приблизительно 20 мг/кг.

В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в неделю.

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в две недели.

В соответствии с еще одним иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в три недели.

В соответствии с дополнительным иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в четыре недели.

В соответствии с дополнительным иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в пять недель.

В соответствии с дополнительным иллюстративным вариантом осуществления изобретения доцетаксел вводят один раз в шесть недель.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 95 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 90 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 85 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 80 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup>.

В соответствии с настоящим изобретением доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 70 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 65 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 70 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 80 мг/м<sup>2</sup>.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят в дозе приблизительно 85 мг/м<sup>2</sup>.



антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе 9 мг/кг один раз в неделю, а доцетаксел вводят в дозе 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе 6 мг/кг один раз в неделю, а доцетаксел вводят в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе 6 мг/кг один раз в неделю, а доцетаксел вводят в дозе 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе 3 мг/кг один раз в неделю, а доцетаксел вводят в дозе 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент является гуманизированным 16B5, и его вводят в дозе 3 мг/кг один раз в неделю, а доцетаксел вводят в дозе 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.

Цикл лечения может длиться, например, 21 день. В течение одного цикла лечения пациент может получать, например, антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент один раз в неделю и доцетаксел один раз в три недели. Пациент может пройти два или более последовательных цикла лечения.

В некоторых вариантах осуществления цикл лечения считается завершенным через период приблизительно семь дней после того, как пациент получил как антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, так и доцетаксел.

Например, когда и антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, и доцетаксел вводят каждую неделю, считается, что цикл лечения составляет 7 дней.

Например, когда антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят каждую неделю, а доцетаксел вводят каждые две недели, цикл лечения считается равным 14 дням.

Например, когда антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят каждую неделю, а доцетаксел вводят каждые три недели, цикл лечения считается равным 21 дню.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления один цикл лечения составляет приблизительно 21 день.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления по существу все циклы лечения составляют приблизительно 21 день.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления каждый цикл лечения составляет приблизительно 21 день.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением пациент может проходить новый цикл лечения каждый 21 день.

В соответствии с настоящим изобретением пациент может пройти по меньшей мере один цикл лечения до выделения ТП.





В соответствии с настоящим изобретением пациент может пройти по меньшей мере девятнадцать циклов лечения после инфузии ТП.

В соответствии с настоящим изобретением пациент может пройти по меньшей мере двадцать циклов лечения после инфузии ТП.

В соответствии с настоящим изобретением пациент может пройти более двадцати циклов лечения после инфузии ТП.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят путем инфузии в течение приблизительно 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят путем инфузии в течение приблизительно 1 часа.

В соответствии с настоящим изобретением антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел вводят в один и тот же день.

Антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел можно вводить отдельно.

Антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел можно вводить последовательно.

В некоторых вариантах осуществления антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят посредством инфузии в течение приблизительно 1 часа, а затем доцетаксел вводят посредством инфузии в тот же день в течение приблизительно 1 часа.

В некоторых вариантах осуществления доцетаксел вводят путем инфузии в течение приблизительно 1 часа, а антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент впоследствии вводят путем инфузии в тот же день в течение приблизительно 1 часа.

Пример 1. Влияние АВ-16В5 на инфильтрацию иммунных клеток в микроокружении опухоли.

Мышам Balb/c ортотопически имплантировали  $5 \times 10^5$  клеток 4Т1 в 4-ю жировую подушечку молочной железы. Животные получали внутрибрюшинную обработку солевым раствором трижды в неделю. Первичную опухоль удаляли хирургическим путем на 16-й день после имплантации. Животных умерщвляли на 36-й день и вырезали легкие. Ткани фиксировали в параформальдегиде и обрабатывали для заливки в парафин. Срезы тканей зондировали антителами против мышинового CD3, против мышинового CD8 и против мышинового B220. Сигналы выявляли с помощью специфических вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена и окрашенных гематоксилином и эозином. Результаты, представленные на Фигуре 1, показывают, что метастазы в легких 4Т1 создают иммунологически холодное микроокружение, которое предотвращает инфильтрацию В- и Т-лимфоцитов в опухоли. Очерченные области указывают на то, что CD3 и CD8 Т-лимфоциты рестриктивны по краю опухоли вследствие ЕМТ.

Животных с опухолями 4Т1 обрабатывали антителом АВ-16В5 (мышиный 16В5) трижды в неделю внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг. Первичную опухоль удаляли

хирургическим путем на 16-й день после имплантации. Животных умерщвляли на 36-й день и вырезали легкие. Ткани фиксировали в параформальдегиде и обрабатывали для заливки в парафин. Срезы тканей зондировали антителами против мышинового CD3, против мышинового CD8 и против мышинового B220. Сигналы выявляли с помощью специфических вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена и окрашенных гематоксилином и эозином. Результаты, представленные на Фигуре 2, показывают, что метастазов в легких, плотно инфильтрированных CD3 и CD8 Т-клетками, было меньше, и они были гораздо меньшего размера. Имелись также доказательства проникновения плазмочитов в опухоли, обработанные 16B5.

Таким образом, АВ-16B5 обеспечивает инфильтрацию иммунных клеток в микроокружение опухоли у иммунокомпетентных мышей. АВ-16B5 может представлять собой новый терапевтический путь для создания более теплого окружения опухоли для стимуляции сильного иммунного ответа против опухолей.

Параллельно были проанализированы биопсии опухолей человека у пациентов, получавших АВ-16B5 (гуманизированное 16B5) в качестве монотерапии (Фигуры 2В-2Е). Пункционные биопсии, полученные от пациента, имеющего метастатический рак щитовидной железы и от пациента с неоперабельным метастатическим раком желудка, делали срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Биопсия во время лечения пациента с метастазами рака щитовидной железы в легкие была получена после второго цикла лечения АВ-16B5. Как показано на Фигуре 2В, по существу все фрагменты опухоли были некротическими. По краю представленного фрагмента наблюдался лимфоплазмочитарный инфильтрат. Макрофаги, нагруженные гемосидерином, наблюдались внутри некротических участков, некоторые из которых отражали транссудацию эритроцитов, связанную с некрозом (не показано). На Фигуре 2С показан периваскулярный инфильтрат, состоящий из плазматических клеток по краю фрагмента опухоли того же пациента. При анализе биоптата до лечения больного с метастатическим раком желудка обнаружено несколько фрагментов слизистой оболочки желудка, инфильтрированных диффузным низкодифференцированным раком желудка (перстневидные клетки). На представленном фрагменте наблюдались очаги некроза с преимущественно острым нейтрофильным инфильтратом. На Фигуре 2Е показана биопсия во время лечения, полученная после второго цикла лечения АВ-16B5, состоящая из трех фрагментов опухоли. Большой фрагмент состоял из нормальной поверхностной слизистой оболочки желудка, а мелкие фрагменты были инфильтрированы смесью нейтрофильных и мононуклеарных иммунных клеток.

Пример 2. Влияние комбинированной терапии АВ-16B5 и доцетаксела на инфильтрацию иммунных клеток в микроокружении опухоли.

Модель рака иммунокомпетентной мыши была выбрана для тестирования степени иммунного ответа при лечении монотерапией АВ-16B5 или комбинацией АВ-16B5 и доцетаксела с использованием мышинового 16B5.

В это исследование были включены пять групп, каждая из которых состояла из 10



самок мышей Balb/c (см. Таблицу 1 ниже). Всем животным подкожно имплантировали клетки карциномы молочной железы мыши 4Т1 в 4-ю паховую молочную железу. Лечение начинали в день имплантации (определяемый как День 1). Животные из группы 1 (Гр. 1) получали IP-обработку контрольным физиологическим раствором два раза в неделю на протяжении всего исследования. Животные из группы 2 (Гр. 2) получали 10 мг/кг доцетаксела еженедельно в течение пяти недель внутрибрюшинно. Животные из группы 3 (Гр. 3) получали 10 мг/кг доцетаксела еженедельно в течение двух недель и 10 мг/кг АВ-16В5 два раза в неделю в течение пяти недель. Животные из 4 группы (Гр. 4) получали 10 мг/кг доцетаксела еженедельно и 5 мг/кг 16В5 два раза в неделю каждый в течение пятинедельного курса лечения. Животные из группы 5 (Гр. 5) получал АВ-16В5 два раза в неделю в течение пяти недель. На 36-й день первичные опухоли вырезали, а на 37-й день животных умерщвляли и подсчитывали количество хорошо видимых метастатических узелков на поверхности легких.

Таблица 1: График дозирования:

Группа #	Обработка	Неделя 1 и 2			Неделя 3-5		
		День 1	День 2	День 4	День 1	День 2 или 3*	День 4
Группа 1	Носитель IP, 2X/неделя в течение 5 недель	Носитель		Носитель	Носитель		Носитель
Группа 2	Доцетаксел 10 мг/кг (IP, 1X/неделя в течение 5 недель)		DTX			DTX	
Группа 3	Доцетаксел 10 мг/кг (IP, 1X/неделя for 2 weeks) and АВ-16В5 10 мг/кг (IP, 2X/неделя в течение 5 недель)	АВ16 В5	DTX	АВ16 В5	АВ16 В5		АВ16 В5
Группа 4	Доцетаксел 10 мг/кг (IP, 1X/неделя for 5 weeks) and АВ-16В5 10 мг/кг (IP, 2X/неделя в течение 5 недель)	АВ16 В5	DTX	АВ16 В5	АВ16 В5	DTX	АВ16 В5

<b>Группа 5</b>	AB-16B5 10 мг/кг (IP, 2X/неделя в течение 5 недель)	AB16 B5		AB16 B5	AB16 B5		AB16 B5
* 2 животных из Группы 4 получали Доцетаксел в тот же День, что и AB16B5 (День 4) на неделе 3							

Результаты, представленные на Фигуре 3, показывают, что легкие животных из Группы 4 и Группы 5 содержали меньше метастатических узелков в легких, чем мыши, получавшие контрольный физиологический раствор. Кроме того, у мышей, которых лечили монотерапией с доцетакселом, было такое же количество метастатических узелков в легких, как и у контрольной группы, получавшей физиологический раствор. Лечение доцетакселом в течение двух недель в комбинации с 16B5 привело к меньшему количеству метастатических узелков в легких, чем в группе 1 и группе 2, но ответ на лечение был не таким обширным, как в Группе 4 и Группе 5. В Группе 4 было больше животных, у которых не удалось обнаружить узелков, чем в любых других группах. Эти результаты позволяют предположить, что монотерапия AB-16B5 или комбинированная терапия с доцетакселом эффективно ингибируют метастатическую инвазию у иммунокомпетентных мышей. Эти результаты также позволяют предположить, что может оказаться предпочтительным введение AB-16B5 и доцетаксела в течение всего курса лечения.

Первичные опухоли вырезали на 16-й день после имплантации, обрабатывали коллагеназой и гиалуронидазой, а иммунные клетки очищали путем положительной селекции с использованием магнитных латексных шариков, покрытых антителом против CD45. Очищенные клетки переносили в небольшие чашки Петри, содержащие культуральную среду, дополненную IL2 и IL7, для проведения фенотипического анализа. Было обнаружено, что очень мало CD45+ присутствовало в первичных опухолях, полученных от животных Групп 1 и 2. Напротив, в опухолях, полученных от животных Групп 3, 4 и 5, было больше иммунных клеток.

Обработка мышей, которым имплантировали опухолевые клетки 4T1, доцетакселом (DTX 5W) была относительно неэффективной. Опухоли 4T1 имеют высокий уровень ЕМТ, что вызывает устойчивость ко многим химиотерапевтическим агентам, включая доцетаксел. Обработка мышей доцетакселом в течение 2 недель и 16B5 в течение 5 недель была не столь эффективной, как обработка 16B5 в монотерапии, возможно, потому, что транзитное воздействие на опухоли доцетаксела приводило к повышению резистентности опухолей. Комбинация доцетаксела с 16B5 в течение 5 недель оказалась наиболее эффективной терапевтической схемой. Комбинированное увеличение количества выделяемых антигенов, вызванное доцетакселом, и ингибирование ЕМТ привело к усилению иммунного ответа, что привело к меньшему количеству метастазов в легких в этой группе по сравнению с 16B5 в монотерапии.

Таким образом, АВ-16В5 в монотерапии и комбинация АВ-16В5 с доцетакселом позволяют инфильтрировать иммунные клетки в микроокружение опухоли у иммунокомпетентных мышей.

Пример 3. Характеристика, очистка и получение инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

Мышам Balb/c ортотопически имплантировали  $5 \times 10^5$  клеток 4Т1 в 4-ю жировую подушечку молочной железы. Животные получали внутривенно (IV) АВ-16В5 (мышиный 16В5) по 10 мг/кг два раза в неделю в комбинации с доцетакселом IV по 10 мг/кг еженедельно (группа 15: животные 1501, 1502 и 1503) или IV АВ-16В5 по 10 мг/кг дважды в неделю (группа 25: животные). Первичную опухоль удаляли хирургическим путем на 16-й день после имплантации. Животных умерщвляли на 36-й день, легкие вырезали и каждый видимый метастаз в легких тщательно иссекали. Каждый видимый метастатический узелок, если таковой имелся, иссекали и обрабатывали для быстрого расширения протокола инфильтрации опухоли лимфоцитами. Метастатические узелки разрезали на небольшие кусочки с краями 2-3 мм, которые выращивали индивидуально в 24-луночных планшетах, содержащих культуральную среду с добавлением FBS, IL2, IL7, ITS (1000 ед/мл IL2, 2,0 нг/мл IL7 и 1X инсулин-трансферрин-селеновый коктейль (Gibco 41400-045)).

После трех недель культивирования из каждой культуры лимфоцитов брали по 100000 клеток (шесть культур, соответствующих трем животным из группы 15 и трем животным из группы 25) и помещали в культуру со 100000 опухолевыми клетками 4Т1. После совместного культивирования в течение ночи супернатант собирали для количественного определения  $INF\gamma$  с помощью ИФА.

Результаты секреции  $INF\gamma$  из культур лимфоцитов в присутствии клеток 4Т1 показывают, что лимфоциты, выделенные из метастатических узелков в легких, секретируют  $INF\gamma$  на высоком уровне, причем самые высокие уровни наблюдаются в группе доцетаксела-16В5 (см. Таблицу 2). Эти результаты подтверждают, что ингибирование EMT с помощью mAb против sCLU 16В5 способствует созданию «теплого» опухолевого микроокружения, которое позволяет Т-лимфоцитам инфильтрироваться в опухоли.

Таблица 2

Образец	$INF\gamma$ пг/мл
1501	5370,0
1502	12488,8
1503	2326,3
2501	8538,8
2502	3770,0
2503	4538,8

Лимфоциты стимулировали моноклональными антителами против CD3 и против

CD28. Лимфоциты от каждого животного-донора были объединены и обработаны для анализа проточной цитометрией с антителами против CD45 (общий антиген лимфоцитов), CD3, CD4, CD8 и CD19 (биомаркер В-клеток) (Фигура 4А и Фигура 4В). Полученные препараты одиночных клеток первоначально отбирали по размеру, чтобы выбрать те, которые соответствуют иммунным клеткам. Их дополнительно гейтировали по FSC/SSC, чтобы исключить мертвые клетки и дебрис. Затем проводили проточно-цитометрический анализ с антителами против CD45, CD3, CD19, CD3, CD4 и CD8. Иммунные клетки, положительные по CD45, гейтировали по CD3 и CD19 (P3). CD3+ клетки далее гейтировали по CD4 и CD8 (Q1-LR).

Результаты показали 80-90% жизнеспособность CD45+ клеток для обеих групп. CD45+клетки из группы 15 (Фигура 4А) включали от 40,2% до 55,0% CD19 клеток и от 14,0% до 21,1% CD3+ клеток. CD3+клетки содержали от 63,7% до 66,5% CD4+ Т-клеток и от 20,6% до 27,0% CD8+Т-клеток. CD45+клетки из группы 25 (Фигура 4В) включали от 14,0% до 35,0% CD19 клеток и от 21,3% до 42,0% CD3+ клеток. CD3+клетки содержали от 63,7% до 66,5% CD4+ Т-клеток и от 20,6% до 27,0% CD8+ Т-клеток.

Пример 4. Оценка иммунореактивности инфильтрирующих опухоль Т-лимфоцитов мышей, получавших АВ-16В5 в комбинации с доцетакселом.

Мышам Balb/c ортотопически имплантировали  $5 \times 10^5$  клеток 4Т1 в 4-ю жировую подушечку молочной железы. Животные получали внутривенно (IP) АВ-16В5 (мышинный 16В5) по 10 мг/кг два раза в неделю в комбинации с доцетакселом IP в дозе 10 мг/кг еженедельно. Первичную опухоль удаляли хирургическим путем на 21-й день после имплантации. Животных умерщвляли на 36-й день, легкие вырезали и каждый видимый метастаз в легких тщательно иссекали. 18 культур лимфоцитов, содержащих от 1 до 3 небольших метастазов в легких, в 24-луночном многолуночном планшете G-Rex (Wilson-Wolf # 80192M). TIL наращивали в определенных средах для наращивания Т-клеток человека R&D Systems™ ExCellerate (#CCM030), содержащих 600 МЕ/мл IL2. После трех недель культивирования из каждой культуры TIL отбирали по 100000 клеток, промывали PBS и помещали в культуру, содержащую 100000 опухолевых клеток 4Т1. После совместного культивирования в течение ночи супернатант собирали и концентрацию INF $\gamma$  оценивали с помощью ИФА. Результаты секреции INF $\gamma$  из культур TIL в присутствии клеток 4Т1 показывают, что лимфоциты, выделенные из метастатических узелков в легких, продуцируют INF $\gamma$  на разных уровнях. На основании современных литературных данных установлено, что культуры Т-клеток, в которых уровень INF $\gamma$  был ниже 300 пг/мл, считались слабыми; уровни от 300 до 500 пг/мл включительно считались средними, а значения выше 500 пг/мл считались высокими (см. Таблицу 3).

Таблица 3

Образец	INF $\gamma$ пг/мл
1	1316
2	1901
3	226
4	110

Образец	INF $\gamma$ пг/мл
5	192
6	1022
7	590
8	2761
9	461
10	1145
11	436
12	523
13	799
14	775
15	424
16	687
17	913
18	297

Как видно из Таблицы 3, все культуры TIL имели уровень секреции INF $\gamma$ , равный или превышающий 100 пг/мл. Четырнадцать из этих культур TIL показали уровень секреции INF $\gamma$ , равный или превышающий 300 пг/мл, а одиннадцать из восемнадцати культур TIL показали уровень секреции INF $\gamma$ , равный или превышающий 500 пг/мл.

Лимфоциты дополнительно анализировали методом проточной цитометрии. Их стимулировали моноклональными антителами против CD3 и против CD28. Лимфоциты из каждой культуры обрабатывали для анализа проточной цитометрией с антителами против CD45, CD3, CD4 и CD8. Полученные препараты одиночных клеток первоначально отбирали по размеру, чтобы выбрать те, которые соответствуют иммунным клеткам. Далее их гейтировали на участке FSC/SSC, чтобы исключить мертвые клетки и дебрис. Затем проводили проточно-цитометрический анализ с антителами против CD45, CD3, CD4 и CD8. Иммунные клетки, положительные по CD45, гейтировали по CD3. Результаты показали, что от 73% до 95% жизнеспособных клеток были CD3-положительными. CD3+клетки дополнительно подвергали гейтированию по CD4 и CD8. Результаты показали, что условия, используемые для выращивания иммунореактивных TIL, были благоприятны для обогащения CD8+T-клеток. Интересно, что культуры с низкой продукцией IFN $\gamma$ , такие как #3 и #5, имели более высокое содержание CD4+T-клеток, что может указывать на присутствие регуляторных CD4+T-клеток.

Таблица 4

Образец	CD8+	CD4+	Нехарактерные CD4- CD8-
1	94%	1%	5%
2	69%	1%	29%
3	61%	18%	21%
4	79%	2%	19%
5	39%	12%	49%
6	69%	4%	27%
7	93%	2%	5%

Образец	CD8+	CD4+	Нехарактерные CD4- CD8-
8	77%	3%	20%
9	73%	0%	27%
10	74%	1%	25%
11	76%	0%	24%
12	73%	1%	26%
13	73%	0%	27%
14	54%	0%	46%
15	56%	1%	43%
16	61%	1%	38%
17	63%	1%	36%
18	47%	1%	52%

Пример 5. Подробный протокол быстрого наращивания ТИЛ.

Следующий протокол быстрого наращивания взят из Jin J. et al., J Immunother. 35(3):283-292, 2012 (полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки).

Начальная фаза культуры

ТИЛ первоначально культивируют из ферментативных гидролизатов опухолей и фрагментов опухолей (1-8 мм<sup>3</sup>), полученных путем острой диссекции. Опухолевые гидролизаты получают путем инкубации в ферментной среде (RPMI 1640, 2 mM Glutmax, 10 мкг/мл гентамицина, 30 ед/мл ДНКазы и 1 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, MilteNY Biotec, Оберн, Калифорния). Сразу после помещения опухоли в ферментную среду ее механически диссоциируют в течение примерно 1 минуты. Затем раствор инкубируют в течение 30 минут при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>, а затем снова механически разрушают в течение примерно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> опухоль механически разрушают в третий раз в течение приблизительно одной минуты. Если после третьего механического разрушения присутствуют большие куски ткани, к образцу применяют одну или две дополнительные механические диссоциации с или без 30-минутной инкубации при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. В конце финальной инкубации, если суспензия клеток содержала большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток проводят разделение в градиенте плотности с использованием фиколла.

Когда культуры ТИЛ иницируют в 24-луночных планшетах (24-луночный кластер клеточных культур Costar, с плоским дном, Corning Incorporated, Корнинг, Нью-Йорк), в каждую лунку засевают  $1 \times 10^6$  клеток опухолевого гидролизата или один фрагмент опухоли размером приблизительно от 1 до 8 мм<sup>3</sup> в 2 мл полной среды (СМ) с ИЛ-2 (6000 МЕ/мл, Chiron Corp., Эмеривилл, Калифорния). СМ состояла из RPMI 1640 с глутамином, дополненным 10% сывороткой человеческих АВ, 25 mM Hepes и 10 мкг/мл гентамицина. Когда культуры иницируют в газопроницаемых колбах емкостью 40 мл и с газопроницаемым силиконовым дном площадью 10 см<sup>2</sup> (G-Rex10, Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, Миннесота, США) (Фигура 1), в каждую колбу загружают 10

до  $40 \times 10^6$  жизнеспособных опухолевых клеток или от 5 до 30 фрагментов опухоли в 10-40 мл CM с IL-2 (рекомбинантный человеческий IL-2). Планшеты G-Rex10 и 24-луночные планшеты инкубируют в увлажненном инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$  и через пять дней после начала культивирования половину среды удаляют и заменяют свежими CM и IL-2, а через 5 дней половину среды меняют каждые 2-3 дня.

#### Фаза наращивания

Протокол быстрого наращивания (REP) TIL выполняют с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов или газопроницаемых колб G-Rex®. Для TIL REP в колбах T-175 в каждую колбу T-175 добавляют  $1 \times 10^6$  TIL, суспендированных в 150 мл среды. TIL культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) в качестве «фидерных» клеток в соотношении 1:100, а клетки культивируют в смеси 1:1 среды CM и AIM-V (50/50 среда), дополненной 3000 ME на мл IL-2 и 30 нг на мл антитела против CD3. Колбы T-175 инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$ . Половину среды заменяют на 5-й день, используя среду 50/50 с 3000 ME на мл IL-2. На 7-й день клетки из двух колб T-175 объединяют в 3-литровый пакет и к 300 мл суспензии TIL добавляют 300 мл AIM V с 5% сывороткой человеческих АВ и 3000 ME на мл IL-2. Количество клеток в каждом пакете подсчитывают каждый день или два и добавляют свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток в пределах от 0,5 до  $2 \times 10^6$  клеток/мл.

Для TIL REP в колбах емкостью 500 мл с газопроницаемым силиконовым дном площадью  $100 \text{ см}^2$  (G-Rex100, Wilson Wolf) (Фигура 1)  $5 \times 10^6$  или  $10 \times 10^6$  TIL культивируют с облученными аллогенными PBMC в соотношении 1 к 100 400 мл среды 50/50, дополненной 5% сыворотки человеческих АВ, 3000 ME на мл IL-2 и 30 нг на мл анти-CD3. Колбы G-Rex100 инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$ . На 5-й день 250 мл супернатанта удаляют, помещают в центрифужные флаконы и центрифугируют при 1500 об/мин (491 g) в течение 10 минут. Осадки TIL ресуспендируют в 150 мл свежей среды с 5% сыворотки человеческих АВ, 3000 ME на мл IL-2 и добавляют обратно в исходные колбы G-Rex100. При серийном наращивании TIL в колбах G-Rex100 на 7-й день TIL в каждой колбе G-Rex100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточную суспензию делят на 3 аликвоты по 100 мл, которые используют для засева 3 колб G-Rex100. Затем в каждую колбу добавляют 150 мл AIM-V с 5% сывороткой человеческих АВ и 3000 ME на мл IL-2. Колбы G-Rex100 инкубируют при  $37^\circ\text{C}$  в 5%  $\text{CO}_2$  и через 4 дня в каждую колбу G-Rex100 добавляют 150 мл AIM-V с 3000 ME на мл IL-2. Клетки собирают на 14-й день культивирования.

Wardell et al. (публикация США № 2018/0282694, полное содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки) раскрывают улучшенный и сокращенный процесс наращивания TIL и создания терапевтической популяции TIL, которая применима к настоящему изобретению.

При желании во время фазы наращивания можно добавить антитело против CD28 и/или антитело против 4-1В.

Подсчет клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

Экспрессию CD3, CD4, CD8 и CD56 измеряют методом проточной цитометрии с антителами от BD Biosciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) с использованием проточного цитометра FACSCanto (BD Biosciences). Клетки подсчитывают вручную с использованием одноразового гемацитометра с с-чипом (VWR, Батавия, Иллинойс), а жизнеспособность оценивают с помощью окрашивания трипановым синим.

Анализы высвобождения цитокинов

TIL оценивают на предмет секреции гамма-интерферона (IFN- $\gamma$ ) в ответ на стимуляцию либо антителом ОКТ3, либо совместной культурой с аутологичным опухолевым гидролизатом. Для стимуляции ОКТ3 TIL тщательно промывают и готовят дублирующиеся лунки с  $1 \times 10^5$  клеток в 0,2 мл СМ в 96-луночных плоскодонных планшетах, предварительно покрытых 0,1 или 1 мкг/мл антитела ОКТ-3, разведенного в PBS. После инкубации в течение ночи супернатанты собирают и IFN- $\gamma$  в супернатанте измеряют с помощью ИФА (Pierce/Endogen, Уобурн, Массачусетс). Для анализа совместной культуры клетки TIL помещают в 96-луночный планшет с аутологичными опухолевыми клетками. После 24-часовой инкубации супернатанты собирают и количественно определяют высвобождение IFN- $\gamma$  с помощью ИФА.

Описанные здесь варианты осуществления и примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема формулы изобретения. По замыслу авторов изобретения, вариации вышеизложенных вариантов осуществления, включая альтернативы, модификации и эквиваленты, включены в формулу изобретения. Цитаты, перечисленные в настоящей заявке, включены сюда посредством ссылки.

Список литературы

Al-Lazikani *et al.*, Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273:927-948, 1997.

Brochet *et al.* IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis. *Nucl Acids Res* 36:W503-W508, 2008.

Andrew C.R. Martin, *Antibody Engineering Vol. 2, Chapter 3: Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains*. R. Kontermann and S. Dubel (eds.), DOI 10.1007/978-3-642-01147-4\_3, # Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010

Shibue, T., Weinberg, R. EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 611-629 (2017).

Terry, S., Savagner, P., Ortiz- Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J.- P. and Chouaib, S., New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Mol Oncol*, 11: 824-846 (2017).

Lenferink, A., Cantin, C., Nantel, A. et al. Transcriptome profiling of a TGF- $\beta$ -induced epithelial-to-mesenchymal transition reveals extracellular clusterin as a target for therapeutic antibodies. *Oncogene* 29: 831-844 (2010).

New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1)" E.A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L.H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey,



S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij; *Eur J Cancer*, 45 (2009) 228 -24 .

Cristiano Ferrario, Julie Laurin, Leon Van Kempen, Caroline Lambert, Alan Spatz, Oksana Markova, Gerald Batist, Adrian Langleben, Mario Fillion, Jacques Jolivet. Phase 1 first-in-human study of anti-clusterin antibody AB-16B5 in patients with advanced solid malignancies [abstract]. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2017; 2017 Apr 1-5; Washington, DC. Philadelphia (PA): AACR; *Cancer Res* 2017;77(13 Suppl): Abstract nr CT098. doi:10.1158/1538-7445.AM2017-CT098.

Hodge, J.W. Garnett, C.T., Farsaci, B., et al. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *Int. J. Cancer*. 133: 624-636 (2013).

Jiang X, Dudzinski S, Beckermann KE, et al. MRI of tumor T cell infiltration in response to checkpoint inhibitor therapy. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 2020;8:e000328. doi:10.1136/jitc-2019-000328.

MacCallum, R. M., Martin, A. C. R. and Thornton, J. T. «Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography» *J. Mol. Biol.* 262:732-745, 1996.

Wu and Kabat, An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132:211-250, 1993.

Таблица 5: ТАБЛИЦА СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

ID	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ	SEQ ID NO:
16B5 CDRL1	KSSQSLNSRTRKNYLA	1
16B5 CDRL2	WASTRES	2
16B5 CDRL3	KQSYNLWT	3
16B5 CDRH1_v1	GFNIKDIYMH	4
16B5 CDRH2_v1	RIDPAYGNTKYDPKFQG	5
16B5 CDRH3_v1	RYDTAMDY	6
16B5 CDRH1_v2	GFNIKDIY	35
16B5 CDRH2_v2	IDPAYGNT	36
16B5 CDRH3_v2	ARRYDTAMDY	37
VL 16B5 мыши	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLNSRTRK NYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSG SGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTK LEFK	7
VH 16B5 мыши	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFNKDIYMH WVKQRPEQGLEWIGRIDPAYGNTKYDPKFQGGKATITA DTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARRYDTAMDY WGGGTSVTVSS	8
VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKN	9

гуманизированного 16B5	YLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIK	
VH гуманизированного 16B5	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAYGNTKYDPKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQGLVTVSS	10
Легкая цепь гуманизированного 16B5	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIKVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	11
Тяжелая цепь гуманизированного 16B5	QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAYGNTKYDPKFQGRVTITADTSTDAYMELSSLRSEDVAVYYCARRYDTAMDYwgqglvtvsSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	12
Нуклеиновая кислота легкой цепи гуманизированного 16B5	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGAGAGACCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGTCCCTGCTGAACTCCCGGACCCGGAAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGATCTACTGGGCCTCCACCCGGGAGTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTACTGCAAGCAGTCC TACAACCTGTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGA TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG	13
Нуклеиновая кислота тяжелой цепи гуманизированного 16B5	ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCCCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACCCACGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCGTCAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACATCTACATGCACTGGGTGCAGCAGG	14

	CTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATGGGCGGATC GACCCTGCCTACGGCAACACCAAGTACGACCCTAA GTTCCAGGGCCGGGTGACCATCACCGCCGACACCT CCACCGACACCGCCTACATGGAAGTGTCTCCCTG CGGTCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCG GAGATACGACACCGCCATGGATTACTGGGGCCAGG GCACCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTTCCACCAAG GGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG AGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAA CTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGT TGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCC CAGCACCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTC TCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCA TCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA GGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACC ACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTC CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC CTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
21B12 CDRL1	KSSQSLLYSSNQKNYLA	15
21B12 CDRL2	WASTRES	16
21B12 CDRL3	QYYIYPRT	17
21B12 CDRH1_v1	GYTFTNYGMH	18
21B12 CDRH2_v1	WINTYTGEPTYADDFKG	19
21B12 CDRH3_v1	DGFLYFFDY	20
21B12 CDRH1_v2	GYTFTNYG	38
21B12 CDRH2_v2	INTYTGEP	39
21B12 CDRH3_v2	DGFLYFFDY	40
VL 21B12 MЫIIIИ	DIVMSQSPSSLA VSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQRPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGS	21

	GTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYIYPRTFGGGTKL EIK	
VH 21B12 МЫШИ	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMHW VKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFS LETSASTAYLQINNLIKNEEDTATYFCARDGFLYFFDYW GQGTTLTVSS	22
VL гуманизованн ого 21B12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKL EIK	23
VH гуманизованн ого 21B12	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMH WVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFV SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDY WGQGLTVTVSS	24
Легкая цепь гуманизованн ого 21B12	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKN YLAWYQQKPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYIYPRTFGQGTKL EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	25
Тяжелая цепь гуманизованн ого 21B12	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMH WVRQAPGQGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFV SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDGFLYFFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV RKCCVECPPEPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQFNSTFRVVSIVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	26
Нуклеиновая кислота легкой цепи гуманизованн ого 21B12	ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTG CTGTGGATCTCTGGCGCCTACGGCGACATCGTGAT GACCCAGTCCCCGACTCTCTGGCTGTGTCCCTGGG CGAGCGGGCCACCATCAACTGCAAGTCCTCCCAGT CCCTGCTGTACTCCTCCAACCAAGAAGTACCTG GCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAA GCTGCTGATCTACTGGGCTCCACCCGGGAATCTG GCGTGCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGC ACCGACTTCACCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGC CGAGGACGTGGCCGTGACTACTGCCAGCAGTACT ACATCTACCCTCGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAG CTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCTCCGT GTTTCATCTTCCCCCTTCCGACGAGCAGCTGAAGTC CGGCACCGCCTCTGTGGTGTGCCTGCTGAACA TCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATC CGTCACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACCTACT CCCTGTCTCCACCTGACCCTGTCCAAGGCCGACT ACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGAC	27

	CCACCAGGGCCTGTCCTCTCCCGTGACCAAGTCCTT CAACCGGGGCGAGTGCTGA	
Нуклеиновая кислота тяжелой цепи гуманизированн ого 21B12	ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTTCTGGTGGC CGCTGCTACCGGCACACACGCCAGGTGCAGCTGG TGCAGTCCGGCTCCGAGCTGAAGAAACCTGGCGCC TCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC CTTCACCAACTACGGCATGCACTGGGTGCGCCAGG CACCTGGACAGGGACTGGAATGGATGGGCTGGATC AACACCTACACCGGCGAGCCTACCTACGCCGACGA CTTCAAGGGCAGATTTCGTGTTCTCCCTGGACACCTC CGTGTCCACCGCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAA GGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGG ACGGCTTCTGTACTTCTTCGACTACTGGGGCCAGG GCACCCTGGTGACCGTGTCTCTGCCTCCACCAAG GGCCCTTCCGTGTTCCCTCTGGCCCCTTGCTCCCGG TCCACCTCTGAGTCTACCGCCGCTCTGGGCTGCCTG GTGAAGGACTACTTCCCTGAGCCTGTGACAGTGTG CTGGA ACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTGCACA CCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACT CCCTGTCTCCGTGGTGACAGTGCCTTCCCTCCA TCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAC AAGCCTTCCAACACCAAGGTGGACAAGACCGTGGA GCGGAAGTGCTGCGTGGAGTGCCCTCCTTGTCTG CTCCTCCTGTGGCTGGCCCTAGCGTGTTCTGTTC CTCCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCCGG ACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTC CCACGAGGACCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAA GCCTCGGGAGGAACAGTTCAACTCCACCTTCCGGG TGGTGTCCGTGCTGACCGTGGTGCACCAGGACTGG CTGAACGGCAAAGAATACAAGTGCAAGGTGTCCAA CAAGGGCCTGCCTGCCCTATCGAAAAGACCATCT CTAAGACCAAGGGCCAGCCTCGCGAGCCTCAGGTG TACACCCTGCCTCCCTCCCGCGAGGAAATGACCAA GAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCT TCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTA ACGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACCACCCT CCTATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTAC AGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGC AGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTC CCTGTCTCCTGGCAAGTGA	28
Вариабельная область легкой цепи 20E11	DIVLTLSPASLAVSLGQRATISCRASQSVNSSNYSYM HWYQQKPGQPPKLLIKYASNLESGVPARFSGSGS FTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGGGTKLEIK	29
Вариабельная область тяжелой цепи 20E11	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYS MKHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGEPTYADDFKGRFAFS LETSASTAYLQINNPKNEDTATYFCARTGSSGYFDCW GQGTTLTVSS	30
Вариабельная область легкой цепи 11E2, Гр1	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMKHWYQ QKSSTSPKLWIYDTSKLAGVPRFSGSGSNGNSYSLTI SSMEAEDVATYYCFQSGSGYPFTFGSGTKLEIK	31

Вариабельная область легкой цепи 11E2, Гр2	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINKYIAWYQ HKPGKGPRLLIHYTSTLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSIS NLEPEDIATYYCLQYDNLRLRTFGGGTKLEIK	32
Вариабельная область тяжелой цепи 11E2	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNW VKQNGKSLEWIGNIDPYYGTPNYNQKFKGKATLTV DKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCALNSLLRLNAMD YWGQGTSVTVSS	33
Вариабельная область тяжелой цепи 16C11	EVQLQQSGPELGKPGASVKISCKASGYSFTGYNMYW VKQSHRKSLEWIGYIDPYNGDTSYNQKSKGKATLTA DRSSSTAYMHLNSLTSEDSGIYYCARGAYGSSYAYW GQGLVAVSA	34
аминокислоты 421 и 443 C-концевой области $\beta$ -субъединицы кластерина человека	LTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVKLF DSDPITVTVPVEVSRKNPKFMETV AEKALQEYRKKHREE	41

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения пациента, имеющего рак, причем способ включает введение пациенту противоопухолевой терапии, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, выделение и наращивание инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТІЛ) из опухоли пациента и реинфузию препарата ТІЛ пациенту.

2. Способ лечения пациента, имеющего рак, причем способ включает введение препарата инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТІЛ), выделенных из опухоли пациента, где пациент ранее получал лечение с использованием противоопухолевой терапии, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент.

3. Способ по п. 1 или 2, где препарат ТІЛ выделяют и наращивают с помощью способа получения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов *in vitro* или *ex vivo*.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где противоопухолевая терапия представляет собой антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент в качестве монотерапии.

5. Способ по пп. 1-3, где противоопухолевая терапия представляет собой комбинированную терапию, включающую антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и химиотерапевтический агент.

6. Способ по п. 4, где химиотерапевтический агент выбран из алкилирующего агента, антиметаболита, алкалоида, противоопухолевого антибиотика или их комбинации.

7. Способ по п. 5, где химиотерапевтический агент представляет собой доцетаксел или паклитаксел.

8. Способ по любому из предыдущих пп., где опухоль является резектабельной.

9. Способ по любому из предыдущих пп., где пациент имеет функциональную иммунную систему.

10. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТІЛ получают из опухоли или фрагментов опухоли, выделенных биопсией.

11. Способ по п. 3, где способ получения препарата инфильтрирующих опухоль лимфоцитов *in vitro* или *ex vivo* включает стадию контакта фрагментов опухоли с антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом.

12. Способ по п. 11, где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент присутствует и/или поддерживается в течение одной или более фаз способа получения препарата инфильтрирующих опухоль лимфоцитов.

13. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТІЛ не является генетически модифицированным.

14. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТІЛ включает ТІЛ, которые являются генетически модифицированными.

15. Способ по п. 14, где препарат ТІЛ включает ТІЛ, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор.

16. Способ по п. 14, где препарат ТІЛ включает ТІЛ, которые экспрессируют

трансгенный Т-клеточный рецептор.

17. Способ по любому из предыдущих пп., где опухоль пациента представляет собой первичную опухоль.

18. Способ по любому из предыдущих пп., где опухоль пациента представляет собой метастаз.

19. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для того, чтобы привести к инфильтрации иммунных клеток в микроокружение опухоли.

20. Способ по любому из пп. 7-19, где доцетаксел вводят в дозе и/или с интервалом введения и/или в течение периода лечения, достаточного для обеспечения индуцированной химиотерапией иммуногенной модуляции опухоли.

21. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области (CDR) переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO:10.

22. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:10.

23. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент содержит легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:11, и тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:12.

24. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способно конкурировать с антителом, содержащим переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:9, и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:10, за связывание кластерина.

25. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат TIL содержит CD4+ Т-клетки.

26. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат TIL содержит CD8+ Т-клетки.



27. Способ по п. 26, где препарат ТПЛ содержит по меньшей мере 50% CD8+ лимфоцитов.
28. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТПЛ содержит В-клетки.
29. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТПЛ содержит НК-клетки.
30. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТПЛ содержит НК-Т-клетки.
31. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТПЛ выбран для распознавания опухолевого антигена.
32. Способ по любому из предыдущих пп., где препарат ТПЛ секретирует  $INF\gamma$  на уровне от среднего до высокого.
33. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе от приблизительно 3 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг до выделения ТПЛ или после инфузии ТПЛ.
34. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 6 мг/кг.
35. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 9 мг/кг.
36. Способ по любому из предыдущих пп., где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент вводят в дозе приблизительно 12 мг/кг.
37. Способ по любому из пп. 7-36, где доцетаксел вводят в дозе от приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> до приблизительно 100 мг/м<sup>2</sup> до выделения ТПЛ или после инфузии ТПЛ.
38. Способ по любому из пп. 7-37, где доцетаксел вводят в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup>.
39. Способ по любому из пп. 7-37, где доцетаксел вводят в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup>.
40. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 12 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.
41. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 12 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.
42. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 9 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно 75 мг/м<sup>2</sup> один раз в три недели.
43. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 9 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно 60 мг/м<sup>2</sup> один раз в три

недели.

44. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе примерно 6 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе примерно  $75 \text{ мг/м}^2$  один раз в три недели.

45. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 6 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно  $60 \text{ мг/м}^2$  один раз в три недели.

46. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 3 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно  $75 \text{ мг/м}^2$  один раз в три недели.

47. Способ по любому из пп. 7-37, где пациента подвергают лечению антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом в дозе приблизительно 3 мг/кг один раз в неделю и доцетакселом в дозе приблизительно  $60 \text{ мг/м}^2$  один раз в три недели.

48. Способ по любому из пп. 7-47, где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел вводят в один и тот же день.

49. Способ по любому из пп. 7-48, где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и/или доцетаксел вводят путем инфузии в течение приблизительно 1 часа.

50. Способ по любому из пп. 7-49, где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел вводят в течение по меньшей мере двух циклов лечения до выделения ТП.

51. Способ по любому из пп. 7-49, где антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент и доцетаксел вводят в течение по меньшей мере двух циклов лечения до после инфузии ТП.

52. Способ по любому из предыдущих пп., где у пациента имеется карцинома.

53. Способ по любому из предыдущих пп., где карцинома является метастатической.

54. Способ по любому из предыдущих пп., где у пациента имеется рак эндометрия, рак молочной железы, рак печени, рак предстательной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак шейки матки, рак яичников, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак легких, рак желудка, рак головы и шеи, рак щитовидной железы, холангиокарцинома, мезотелиома или меланома.

55. Способ по любому из предыдущих пп., где у пациента имеется метастатический рак эндометрия, метастатический рак молочной железы, метастатический рак печени, метастатический рак предстательной железы, метастатический рак почки, метастатический рак мочевого пузыря, метастатический рак шейки матки, метастатический рак яичников, метастатический колоректальный рак, метастатический

рак поджелудочной железы, метастатический рак легких, метастатический рак желудка, метастатический рак головы и шеи, метастатический рак щитовидной железы, метастатическая холангиокарцинома, метастатическая мезотелиома или метастатическая меланома.

56. Способ по любому из предыдущих пп., где у пациента нет иммуносупрессии или он не получал иммуносупрессивное лекарственное средство в течение 7 дней до лечения антителом против кластерина или его антигенсвязывающим фрагментом или до лечения с использованием комбинированной терапии в виде антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента и доцетаксела.

57. Способ по любому из предыдущих пп., где пациент получает препаративную схему, истощающую лимфоциты, до инфузии ТП.

58. Способ по любому из предыдущих пп., где пациентом является человек.

59. Препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), полученный способом по любому из пп. 1-58.

60. Препарат инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), полученный способом лечения пациента, имеющего рак, с помощью противоопухолевой терапии, которая включает антитело против кластерина или его антигенсвязывающий фрагмент, выделение и наращивание инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) из опухоли пациента.

61. Препарат ТП по п. 60, где пациента подвергали или подвергают лечению с использованием антитела против кластерина или его антигенсвязывающего фрагмента в виде монотерапии или в составе комбинированной терапии с химиотерапевтическим агентом.

62. Препарат ТП по п. 60 или 61, где препарат ТП не является генетически модифицированным.

63. Препарат ТП по п. 60 или 61, где препарат ТП содержит генетически модифицированные ТП.

64. Препарат ТП по п. 63, где препарат ТП содержит ТП, которые экспрессируют химерный антигенный рецептор.

65. Препарат ТП по п. 63, где препарат ТП содержит ТП, которые экспрессируют трансгенный Т-клеточный рецептор.

66. Препарат ТП по любому из пп. 60-65, где препарат ТП предоставлен в пакете для инфузии.

67. Препарат ТП по любому из пп. 60-66, где препарат ТП содержит большую часть CD45+ клеток.

68. Препарат ТП по любому из пп. 60-67, где препарат ТП содержит большую часть CD3+ клеток.

69. Препарат ТП по любому из пп. 60-68, где препарат ТП содержит большую часть CD4+ клеток.

70. Препарат ТП по любому из пп. 60-68, где препарат ТП содержит большую часть CD8+ клеток.

71. Препарат ТИЛ по п. 69, где препарат ТИЛ содержит по меньшей мере 50% CD8+ лимфоцитов.

72. Препарат ТИЛ по любому из пп. 60-66, где препарат ТИЛ содержит ТИЛ, которые секретируют INF $\gamma$  на уровне от среднего до высокого.

73. Препарат ТИЛ по любому из пп. 60-66, где препарат ТИЛ содержит большую часть клеток, которые представляют собой CD4+ клетки или CD8+ клетки.

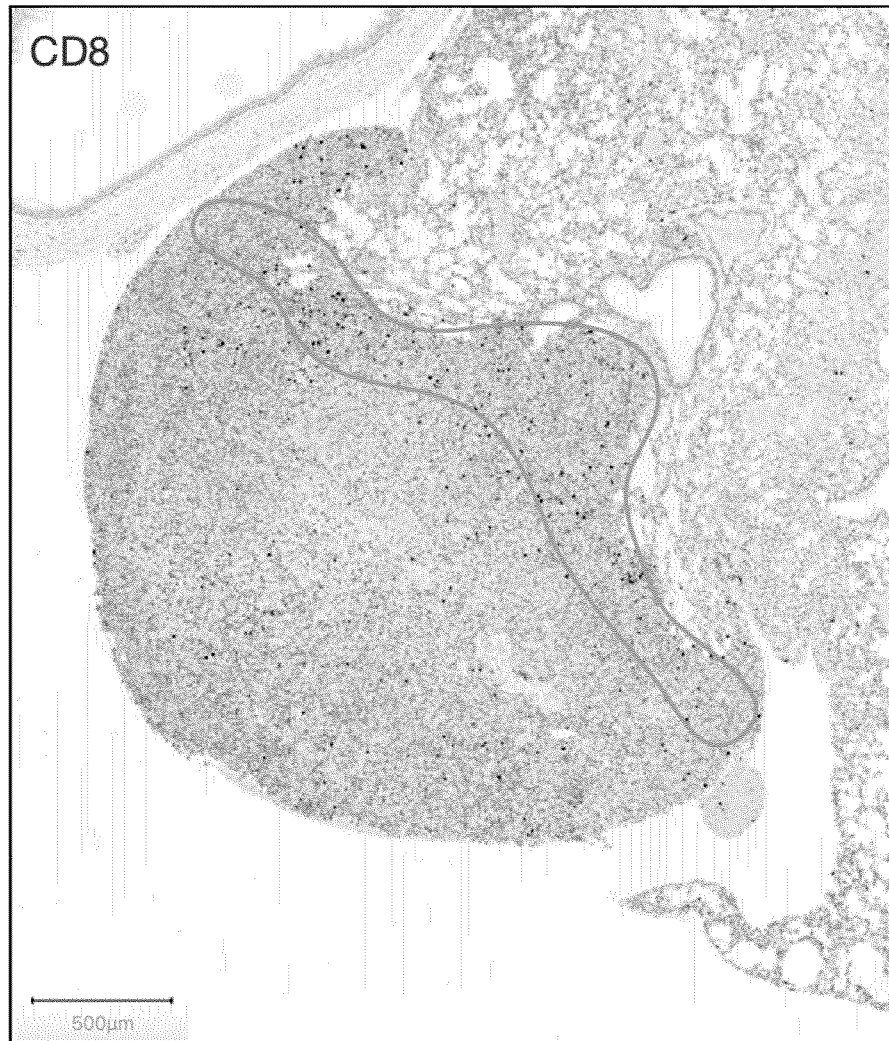
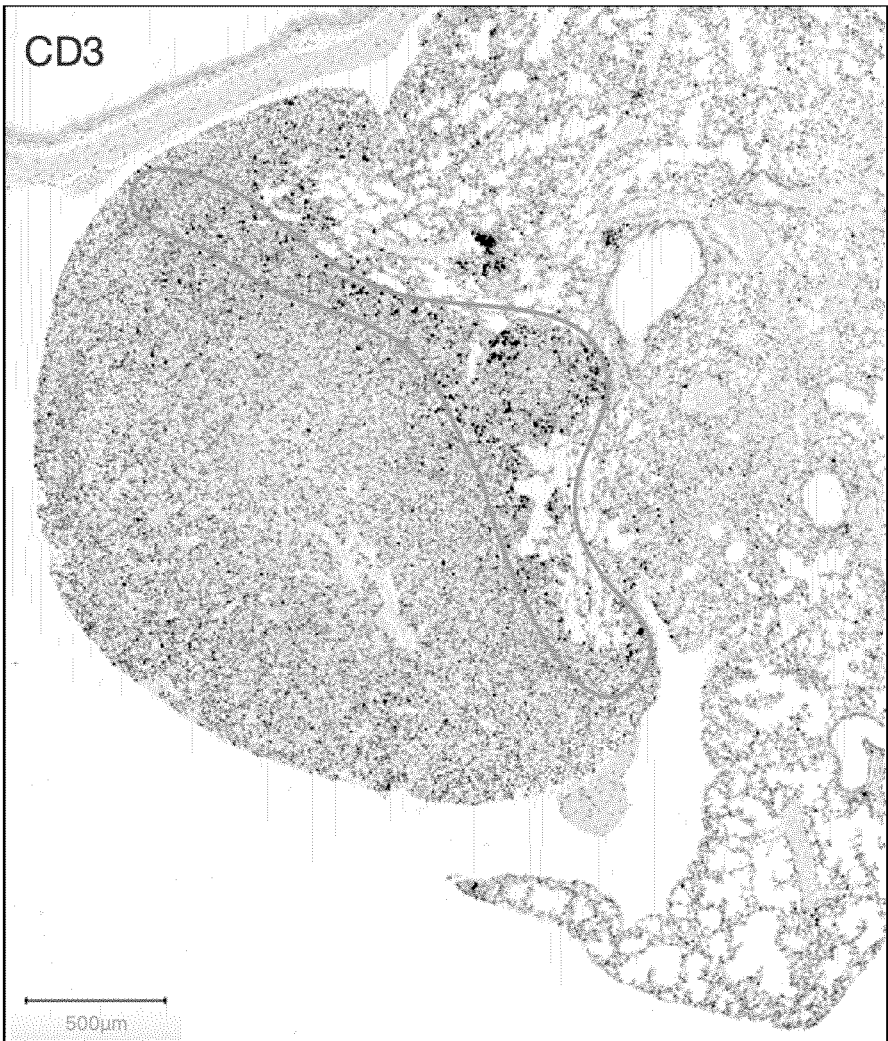
74. Препарат ТИЛ по любому из пп. 60-72, где препарат ТИЛ предназначен для применения в адоптивной клеточной терапии.

75. Изделие производства, включающее препарат ТИЛ по любому из предыдущих пп.

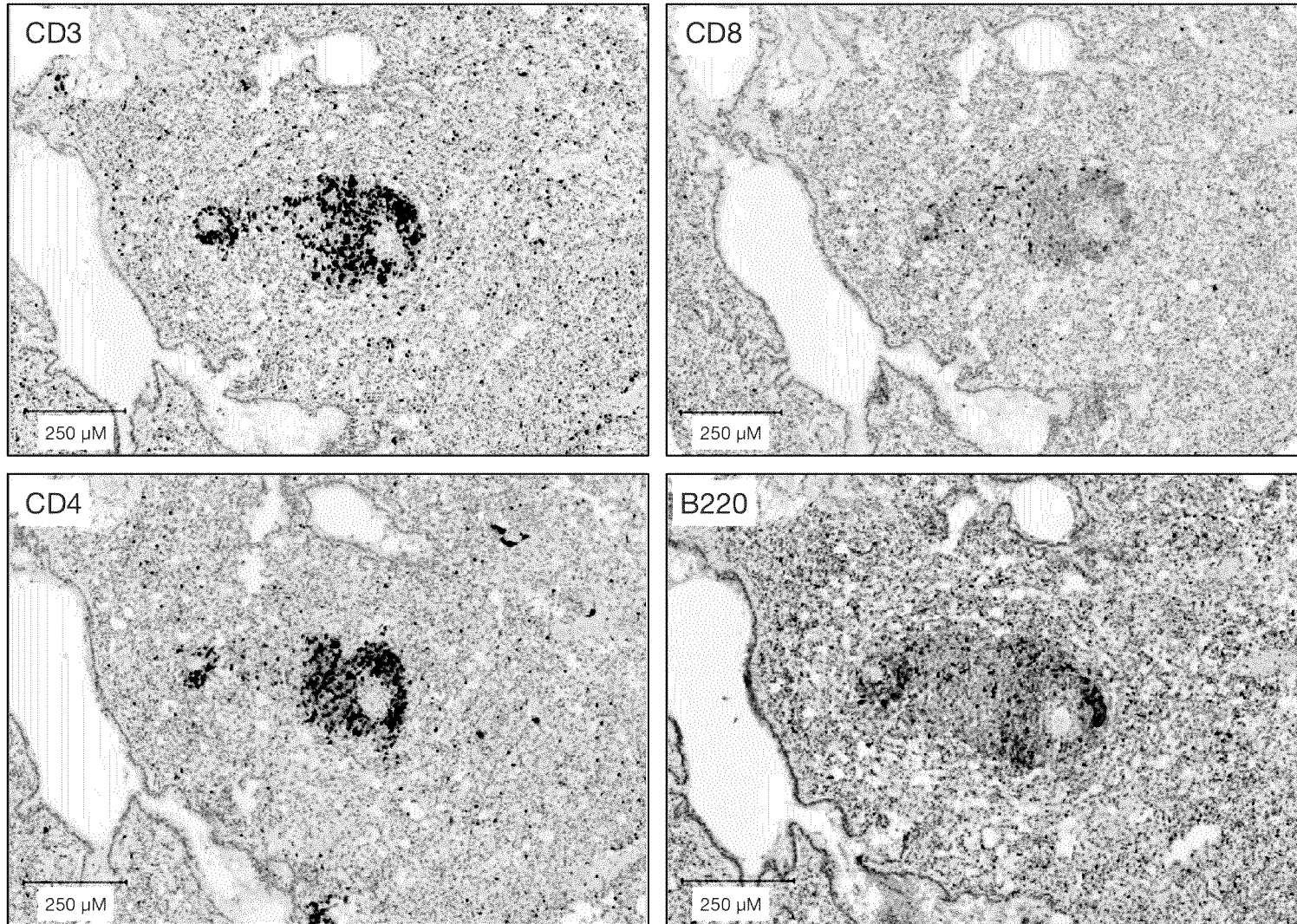
76. Культура инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ), полученная способом по любому из пп. 1-58.

По доверенности

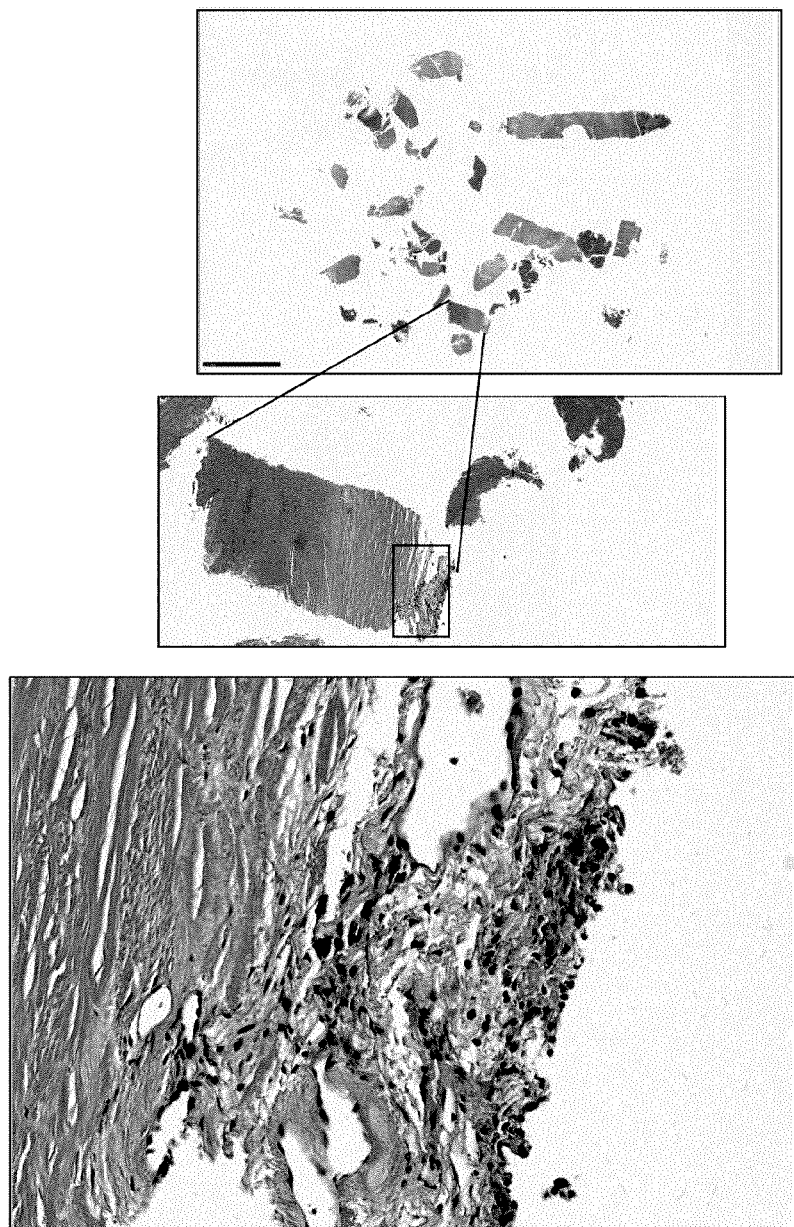
ФИГ. 1



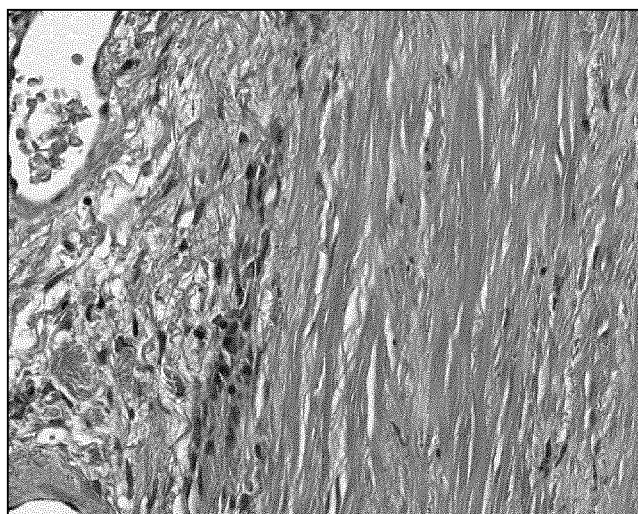
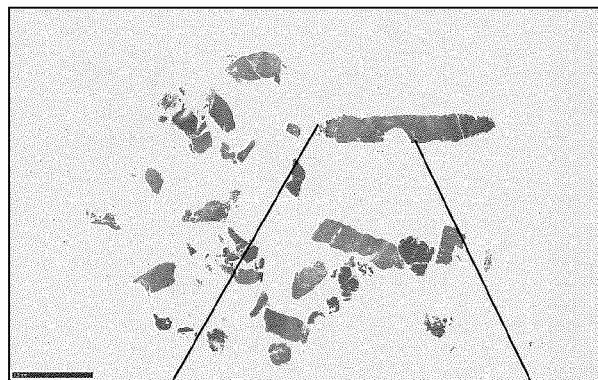
ФИГ. 2А



ФИГ. 2В

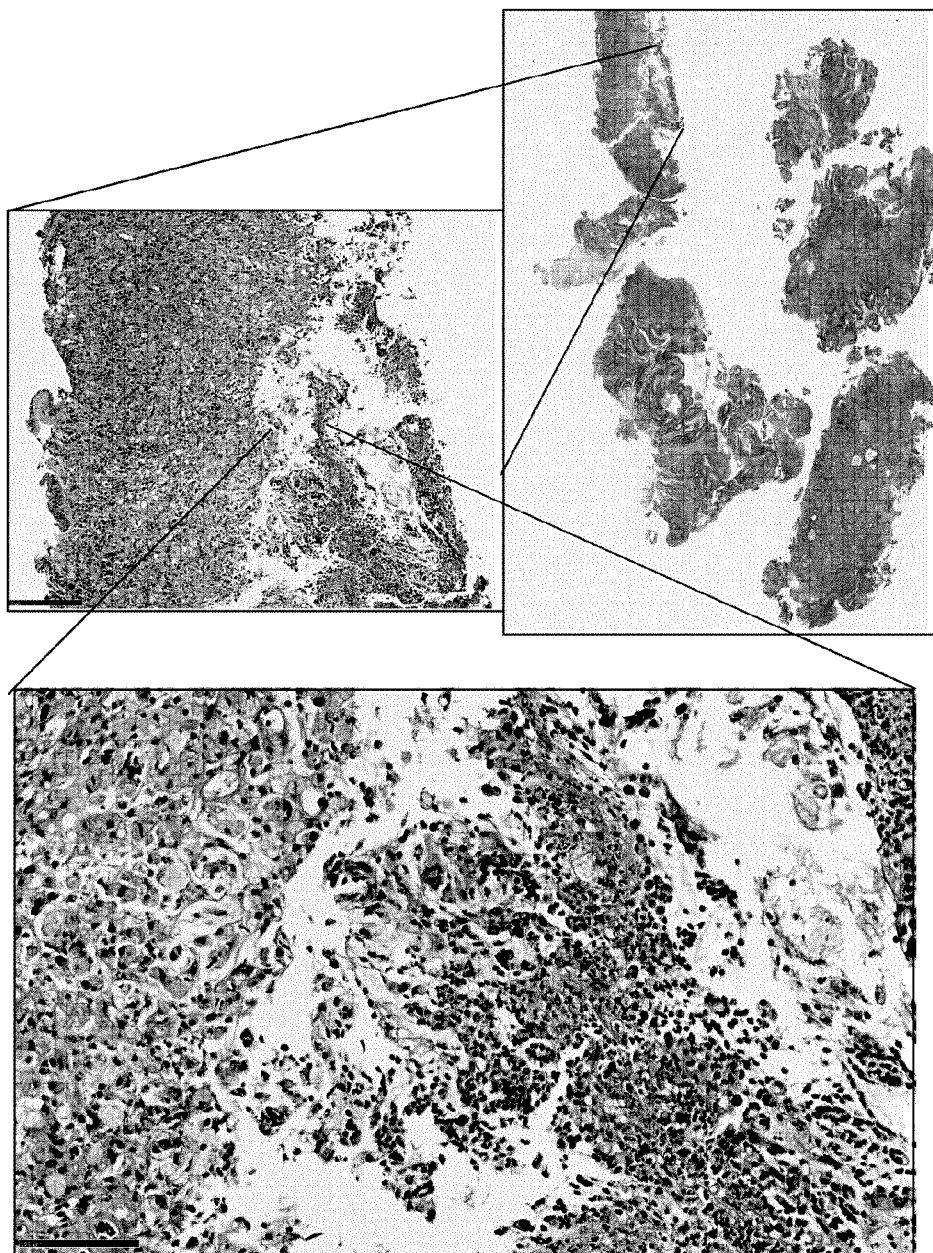


ФИГ. 2С

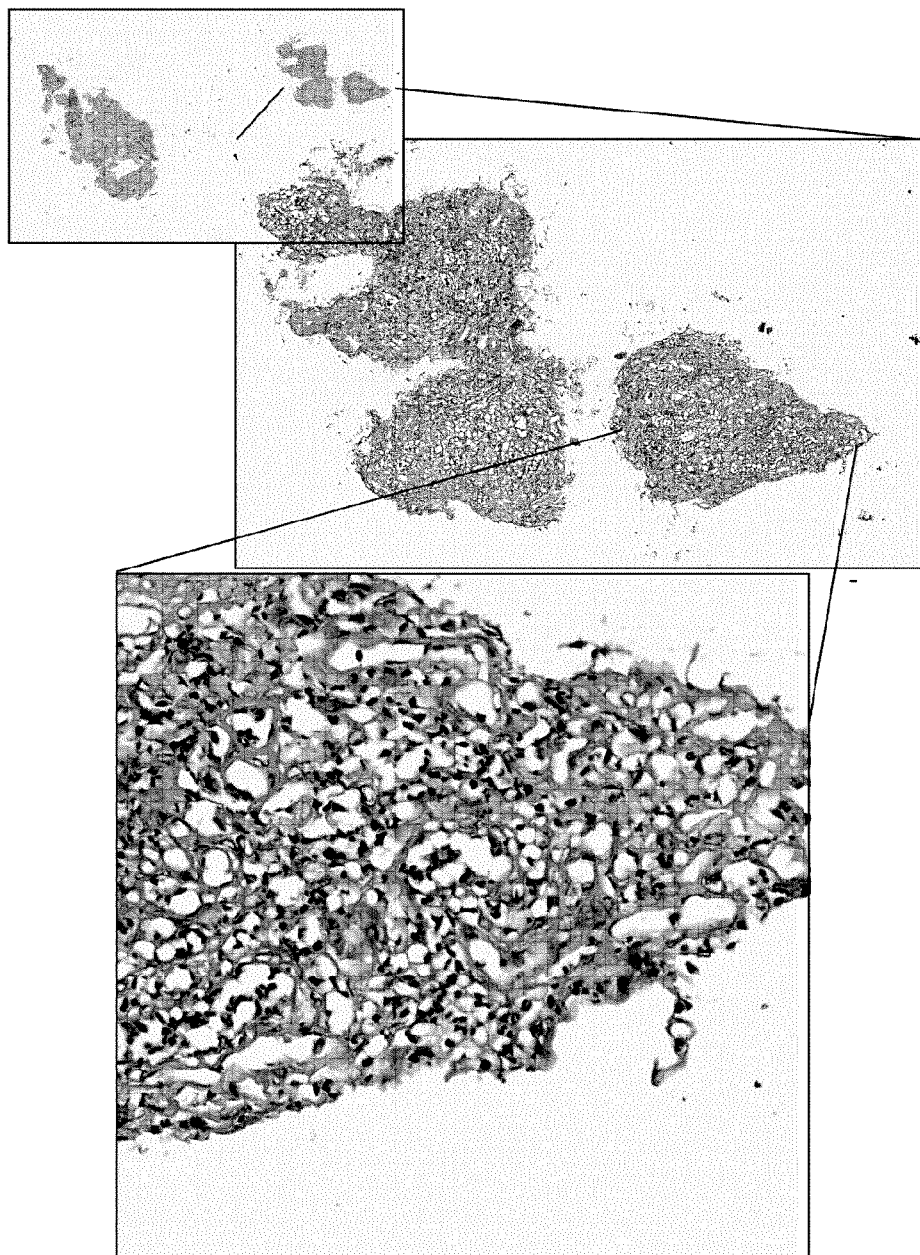




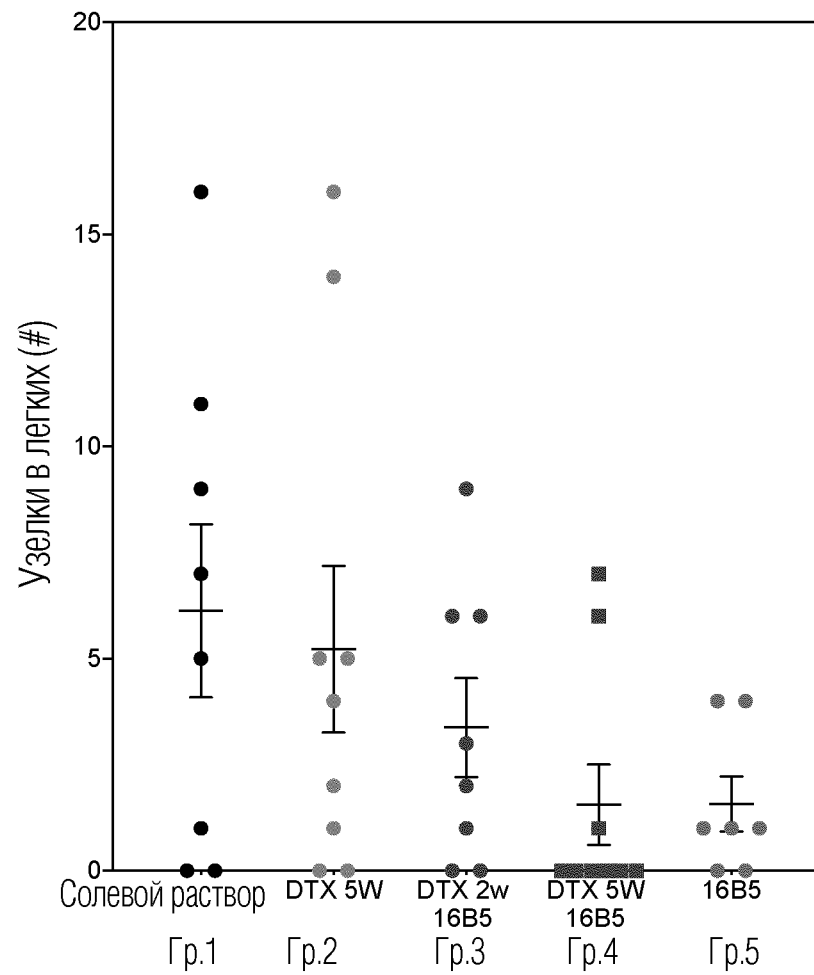
ФИГ. 2D

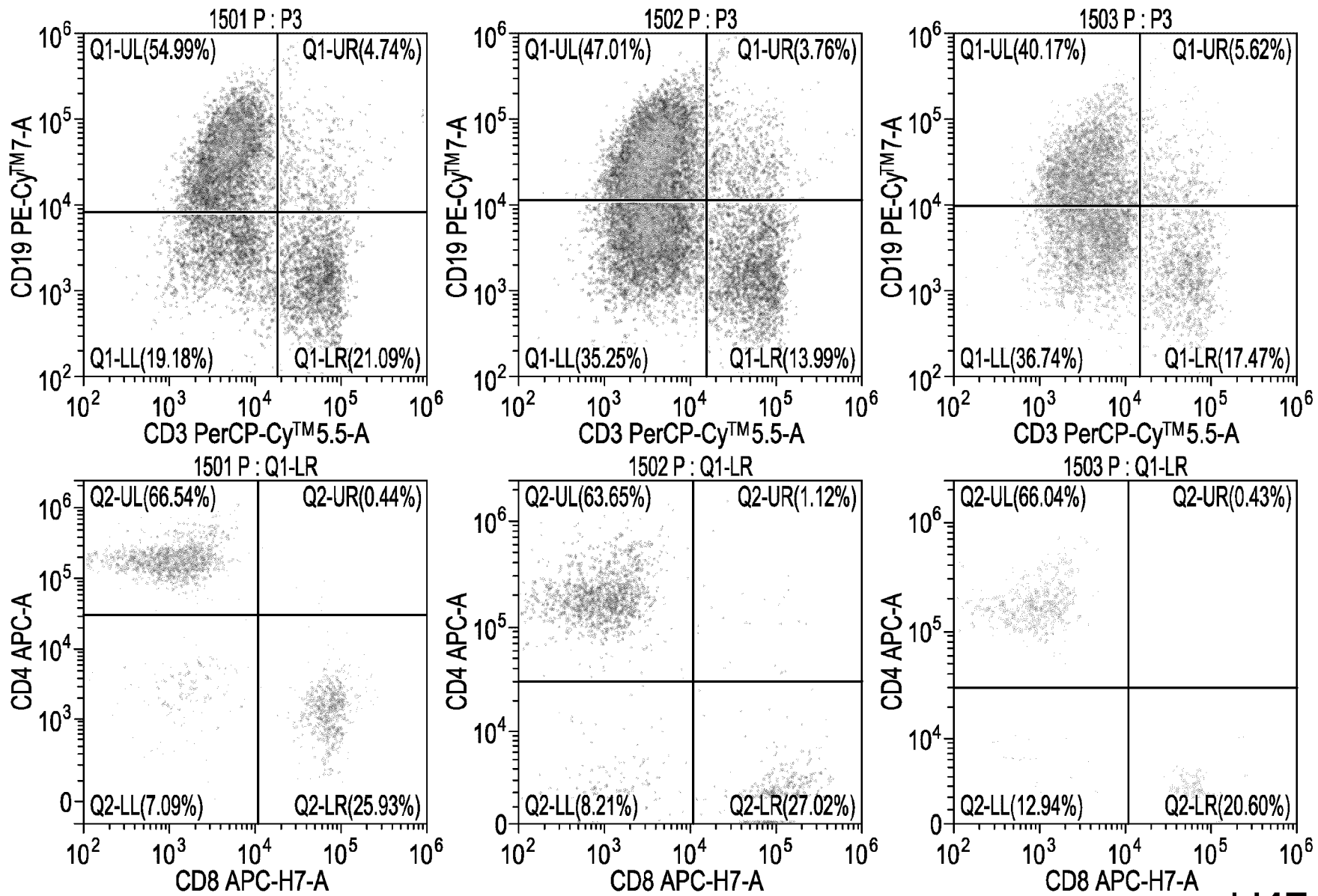


ФИГ. 2Е

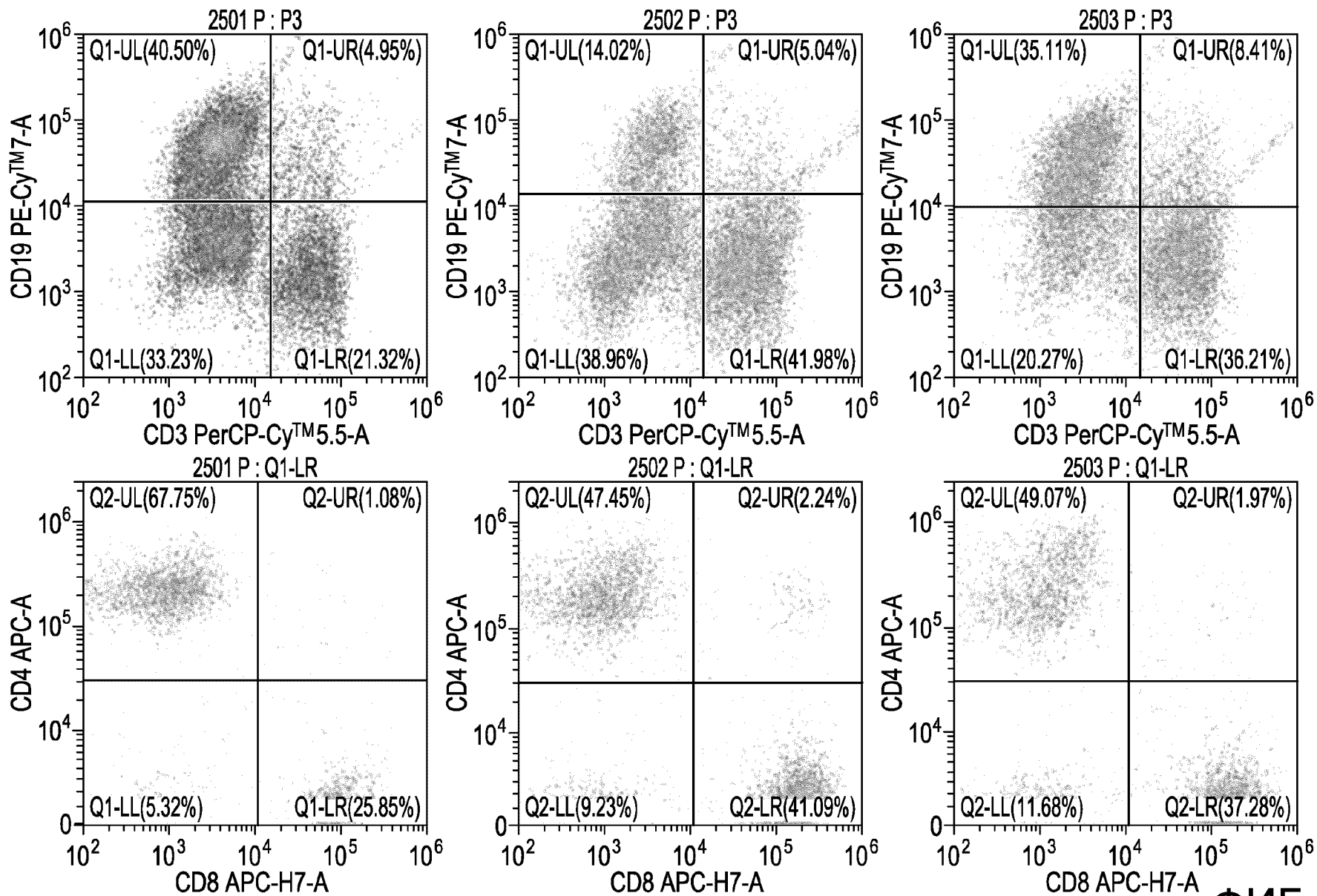


ФИГ. 3





ФИГ. 4А



6/6

ФИГ. 4В