

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991046** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки
2020.01.29(51) Int. Cl. *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)(22) Дата подачи заявки
2017.10.26(54) **РЕСТИМУЛЯЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ**

(31) 62/413,387; 62/413,283; 62/415,452

(72) Изобретатель:

(32) 2016.10.26; 2016.10.26; 2016.10.31

Франк Йен, Лотце Майкл Т. (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2017/058610

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2018/081473 2018.05.03

(71) Заявитель:

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

(57) Настоящее изобретение относится к способам рестимуляции популяций TIL, приводящей к улучшению фенотипа и к усилению метаболического дыхания TIL, а также к способам анализа на популяции TIL для определения возможности их более эффективной инфузии после рестимуляции.

Таблица 1

Тип опухоли	Ox Pncos (пмоль/мин) Базальное дыхание SFC SFC (% от базального уровня) Гликолиз (мРЧ/мин) Базальный гликолиз Гликолитический резерв Гликолитический запас (% от базального уровня)	Свежие продукт		Криоконсервированный продукт	
		После сбора	После оттаивания	После оттаивания	После рестимуляции
Злокачественная меланома (M1053T) FEP		17.5 ± 4.4	9.5 ± 4.9	27.5 ± 12.1	22.5 ± 2.5
		19.3 ± 9.0	27.5 ± 12.1	389.8 ± 127.4	16.8 ± 2.6
		210.6 ± 51.4			174.7 ± 11.3
		31.1 ± 4.4	22.5 ± 1.2	20.7 ± 2.2	103.1 ± 5.4
		26.4 ± 5.5			15.9 ± 7.7
		185.1 ± 17.6	192.0 ± 9.9		115.5 ± 7.4

A1**201991046****201991046****A1**

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-556341EA/055

**РЕСТИМУЛЯЦИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ
ЛИМФОЦИТОВ****Перекрестная ссылка на родственной заявки**

[0001] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патенты США № 62/413283 и 62/413387, поданные 26 октября 2016 под заголовком «Рост опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и способы их применения», и предварительной заявки на патент США № 62/415452, поданной 31 октября 2016 под заголовком «Рестимуляция криоконсервированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов», где указанные заявки во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники

[0002] Лечение крупных и трудноизлечимых раковых опухолей посредством адоптивного переноса опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) представляет собой эффективный способ лечения пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, et al., *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 383-393. Для успешного проведения иммунотерапии необходимо большое число TIL, а для коммерциализации необходима разработка надежного и эффективного способа их получения. Это может представлять определенные трудности из-за технических проблем, проблем с транспортировкой и регуляцией выхода клеток при их размножении. Размножение TIL на основе IL-2 с последующим «быстрым процессом их размножения» (REP) становится предпочтительным способом размножения TIL благодаря скорости и эффективности такого размножения. 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 приводить к 1000-кратному размножению TIL за 14 дней, хотя для этого требуется большой избыток (например, 200-кратный) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), которые часто берут у многих доноров в качестве фидерных клеток, а также анти-CD3 антител (ОКТ3) и больших доз IL-2. Dudley, et al., *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42.

[0003] TIL, которые были подвергнуты процедуре REP, были успешно использованы для адоптивной клеточной терапии после

иммуносупрессии у пациентов-хозяев с меланомой. Параметры инфузии, применяемые в настоящее время, основаны на данных композиции TIL (например, позитивных по CD28, CD8 или CD4), а также кратности размножения и жизнеспособности продукта REP.

[0004] Однако, современные протоколы REP, а также современные протоколы размножения TIL, в основном, не дают полного представления о жизнеспособности TIL, которые должны быть введены пациенту путем инфузии. Т-клетки подвергаются сильному метаболическому сдвигу в процессе их созревания из «необученных» клеток в эффекторные Т-клетки (см., публикацию Chang, et al., *Nat. Immunol.* 2016, 17, 364, которая точно и во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки, а в частности, для обсуждения маркеров анаэробного и аэробного метаболизма). Так, например, «необученные» Т-клетки, в результате митохондриального дыхания продуцируют АТР, а зрелые здоровые эффекторные Т-клетки, такие как TIL, обладают в высокой степени гликолитическими свойствами в результате аэробного гликолиза, что позволяет получить биоэнергетические субстраты, необходимые для пролиферации, миграции и активации клеток и обладающие противоопухолевой активностью.

[0005] Кроме того, эти размноженные клеточные популяции могут быть подвергнуты криоконсервации, что облегчает их применение и позволяет осуществлять длительное хранение препаратов для многократной инфузии пациентам с рецидивирующим заболеванием и другими заболеваниями. Однако, параметры инфузии, применяемые в настоящее время, зависят от данных композиции TIL, а также от кратности размножения и жизнеспособности продукта, полученного на основе размноженных TIL. Эти параметры не дают полного представления о жизнеспособности TIL, которые должны быть введены пациенту путем инфузии, а также точно не известно, влияет ли криоконсервация на эффективность популяции TIL.

[0006] В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к способам размножения и рестимуляции популяций TIL, способствующим улучшению фенотипа и повышению жизнеспособности TIL при метаболизме, а также к способам анализа популяций TIL в целях определения их пригодности для более эффективной инфузии после рестимуляции.

Краткое описание сущности изобретения

[0007] Настоящее изобретение относится к способам увеличения числа TIL, а в некоторых случаях, получения

терапевтических популяций в комбинации с необязательной криоконсервацией.

[0008] В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением терапевтической популяции TIL, где указанный способ включает следующие стадии:

(i) получения первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;

(ii) осуществления первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(iii) осуществления второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL.

[0009] В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ также включает:

(iv) осуществление дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная терапевтическая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

[0010] В некоторых вариантах осуществления изобретения, после стадии (iii), клетки удаляют из клеточной культуры и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением стадии (iv).

[0011] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением стадии (iv), клетки оттаивают.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения,

стадию (iv) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL, в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) проводят в течение приблизительно 44 дней.

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки стадий (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

[0016] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции TIL в стадии (iv), в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения,

способ также включает стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей T-клеточный сигнал.

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтическую популяцию TIL вводят пациенту путем инфузии.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадия (iii) также включает стадию удаления клеток из клеточной культуральной среды.

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (iii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[0025] Настоящее изобретение также относится к популяции размноженных TIL, полученной способом по пункту 1.

[0026] Настоящее изобретение также относится к популяции размноженных TIL, полученной способом по пункту 1, где размноженные TIL обладают по меньшей мере в два раза более сильным базальным гликолизом по сравнению с оттаянными криоконсервированными TIL.

[0027] Настоящее изобретение также относится к способам оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной описанными здесь способами, где указанные способы включают оценку базального гликолиза клеток.

[0028] Настоящее изобретение также относится к способам оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной описанными здесь способами, где указанные способы включают оценку базального клеточного дыхания.

[0029] Настоящее изобретение также относится к способам оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной описанными здесь способами, где указанные способы включают оценку на недостаточную дыхательную способность (SRC) клеток.

[0030] Настоящее изобретение также относится к способам оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной описанными здесь способами, где указанные способы включают оценку гликолитического резерва клеток.

[0031] Настоящее изобретение также относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением терапевтической популяции TIL, где указанный способ включает:

(i) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, выделенных из опухоли, вырезанной у пациента, в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(ii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает:

(iii) осуществление дополнительного второго размножения третьей популяции TIL путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (ii), где более крупная терапевтическая популяция TIL имеет увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

[0033] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки клеточной культуральной среды стадия (ii) удаляют и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением стадии (iii).

[0034] В некоторых вариантах осуществления изобретения,

перед проведением стадии (iii), клетки оттаивают.

[0035] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (ii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

[0036] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[0037] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[0038] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0039] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0040] Настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума с раком, где указанный способ включает введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) и включает:

(i) получение первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL,

которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией T1L; и

(iv) введение пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции T1L.

[0041] В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ, перед проведением стадии (iv), включает проведение стадии дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции T1L дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции T1L, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная терапевтическая популяция T1L включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией T1L.

[0042] В некоторых вариантах осуществления изобретения, после стадии (ii), клетки удаляют из клеточной культуральной среды и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением дополнительного второго размножения описанными здесь способами.

[0043] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением дополнительного второго размножения описанными здесь способами, клетки оттаивают.

[0044] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (iii) повторяют от 1 до 4 раз в целях получения T1L в терапевтической популяции T1L в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы T1L.

[0045] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество T1L, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[0046] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[0047] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27,

экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0048] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0049] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы, негативного по трем признакам, и немелкоклеточной карциномы легких.

[0050] Настоящее изобретение также относится к способу лечения индивидуума с раком, где указанный способ включает введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), а также включает:

(i) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, взятых из опухоли, вырезанной у пациента, в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(ii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и

(iii) введение пациенту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL.

[0051] В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ, перед проведением стадии (iii), также включает проведение стадии дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической

популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (ii), где более крупная терапевтическая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

[0052] В некоторых вариантах осуществления изобретения, после стадии (ii), клетки удаляют из клеточной культуральной среды и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением дополнительного второго размножения как описано в настоящей заявке.

[0053] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением описанного здесь дополнительного второго размножения, клетки оттаивают.

[0054] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (ii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

[0055] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[0056] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[0057] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0058] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0059] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы, негативного по трем признакам, и немелкоклеточной карциномы легких.

[0060] Настоящее изобретение также относится к способам проведения анализа для определения жизнеспособности TIL. Настоящее изобретение также относится к способам анализа TIL на жизнеспособность путем размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением более крупной популяции TIL, где указанные способы включают:

(i) получение первой популяции TIL, которые были предварительно размножены;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (АРС) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и где третью популяцию также анализируют на жизнеспособность.

[0061] В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ также включает:

(iv) проведение стадии дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и АРС, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL, и где третью популяцию также анализируют на жизнеспособность.

[0062] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением стадии (i), клетки подвергают криоконсервации.

[0063] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением стадии (i), клетки оттаивают.

[0064] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (iv) повторяют от одного до четырех раз с получением TIL

в количестве, достаточном для проведения анализа.

[0065] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней.

[0066] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней.

[0067] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней.

[0068] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

[0069] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки стадий (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток.

[0070] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[0071] В некоторых вариантах осуществления изобретения, PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

[0072] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции T1L в стадии (iv), в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0074] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

[0075] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию трансдукции первой популяции T1L экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[0076] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[0077] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей T-клеточный сигнал.

[0078] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[0079] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность.

[0080] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации.

[0081] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации и после стадии (iv).

[0082] В соответствии с раскрытием настоящего изобретения, способ включает анализ TIL на жизнеспособность и/или их последующее применение для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ анализа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) включает:

- (i) получение первой популяции TIL;
- (ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и
- (iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 раз превышает вторую популяцию TIL;
- (iv) сбор, промывку и криоконсервацию третьей популяции TIL;
- (v) хранение криоконсервированных TIL при криогенной температуре;
- (vi) оттаивание третьей популяции TIL с получением оттаянной третьей популяции TIL; и
- (vii) осуществление дополнительного второго размножения

части оттаянной третьей популяции TIL путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC для reREP в течение по меньшей мере 3 дней, где третье размножение проводят для получения четвертой популяции TIL, где число TIL в четвертой популяции TIL сравнивают с числом TIL в третьей популяции TIL с получением численного отношения;

(viii) определение, исходя из отношения в стадии (vii), может ли оттаянная популяция TIL быть подходящей для введения пациенту;

(ix) введение терапевтически эффективной дозы оттаянной третьей популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL превышает 5:1 в стадии (viii).

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения, осуществление reREP продолжают до тех пор, пока отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL не превышало 50:1.

[0084] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[0085] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

[0086] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки стадий (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетками являются TIL.

[0087] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления

изобретения, РВМС добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

[0088] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в более крупной популяции TIL в стадии (iii) или (vii), в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[0089] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[0090] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

[0091] В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[0092] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[0093] В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей Т-клеточный сигнал.

[0094] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[0095] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после стадии (vii).

[0096] Настоящее изобретение также относится к способам анализа TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение относится к способу анализа TIL, включающему:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) оттаивание части первой популяции криоконсервированных TIL;

(iii) осуществление первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC) для проведения reREP по меньшей мере в течение 3 дней с получением второй популяции TIL, где часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL и получают отношение числа TIL, где отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 5:1;

(iv) определение, исходя из отношения в стадии (iii), может ли первая популяция TIL быть подходящей для ее использования в целях терапевтического введения пациенту;

(v) оценку возможности применения первой популяции TIL для терапевтического введения, если отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в первой популяции TIL превышает 5:1 в стадии (iv).

[0097] В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 50:1.

[0098] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает осуществление размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i) способами, описанными в любом из представленных здесь вариантов осуществления изобретения.

[0099] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i).

[00100] Настоящее изобретение также относится к способам анализа TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение относится к способу анализа TIL, включающему:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) оттаивание части первой популяции криоконсервированных TIL;

(iii) осуществление первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC) для проведения reREP по меньшей мере в течение 3 дней с получением второй популяции TIL,

где часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL и получают отношение числа TIL, где отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 5:1;

(iv) определение, исходя из отношения в стадии (iii), может ли первая популяция TIL быть подходящей для ее использования в целях терапевтического введения пациенту; и

(v) терапевтическое введение остальной части первой популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в первой популяции TIL превышает 5:1 в стадии (iv).

[00101] В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 50:1.

[00102] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает осуществление размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i) способами, описанными в любом из предшествующих пунктов.

[00103] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i).

[00104] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию оценки метаболического дыхания второй популяции TIL.

[00105] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию оценки фенотипа второй популяции TIL.

[00106] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

Краткое описание чертежей

[00107] **Фигура 1:** Показаны результаты Примера 1. Как показано на таблице, после проведения протокола быстрого размножения посредством рестимуляции антигеном («reREP»), было обнаружено, что TIL имеют заметно усиленное гликолитическое дыхание. SRC=недостаточная дыхательная способность.

[00108] **Фигура 2:** Состав свежих и оттаянных TIL. TIL окрашивали на TCR $\alpha\beta$ и CD56 для определения популяций Т-клеток и НК. Данные представлены как среднее для 6 отдельных TIL.

[00109] **Фигура 3:** Фенотип памяти определяют по уровню

экспрессии CD45RA и CCR7. CD4⁻ и CD8-TIL представляют собой, главным образом, эффекторные клетки памяти (EM). Это также относится и к оттаянным TIL. Каждая точка соответствует одному анализируемому образцу. Ранговый критерий знаков соответствия пар Уилкоксона не выявил каких-либо значимых различий.

[00110] **Фигура 4:** Корреляция Пирсона частоты встречаемости CD4, CD8, CD4⁺CD28⁺ и CD8⁺CD28⁺ для свежих и оттаянных TIL. Клетки окрашивали вышеуказанными маркерами. Каждая точка соответствует одному индивидууму, для которого были получены величины, вычисленные для свежих клеток и отложенные по оси X, и величины, вычисленные для оттаянных клеток и отложенные по оси Y. Линейный график был построен по данным линейного регрессионного анализа.

[00111] **Фигура 5:** Сравнительные маркеры активации для свежих и оттаянных TIL. Ранговый критерий соответствия пар Уилкоксона не выявил каких-либо значимых различий в статусе активации свежих и оттаянных TIL. Каждая точка соответствует одному анализируемому образцу и представлена как среднее ± ср. кв.ош.

[00112] **Фигура 6:** Сохранение LAG-3-окраски после криоконсервации и оттаивания. А: LAG-3-окрашивание CD8 TIL. В: % частоты регуляторных молекул популяций CD4 и CD8 на свежих и оттаянных TIL. % Оттаянных CD8⁺TIM-3⁺ и CD8⁺LAG-3⁺-TIL был ниже, чем процент свежих TIL. Статистический критерий Манна-Уитни.

[00113] **Фигура 7:** В значительной степени стабильный фенотип опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) для инфузии после криоконсервации.

[00114] **Фигура 8:** График рассеяния, представляющий фенотипическую характеристику reREP-TIL. Q1 означает 19,0% CD45RA⁺/CCR7⁻; Q2 означает 0,066% CD45RA⁺/CCR7⁺; Q4 означает 80,6% CD45RA⁻/CCR7⁻; и Q3 означает 0,36% CD45RA⁻/CCR7⁺.

[00115] **Фигура 9:** Диаграмма и данные, иллюстрирующие фенотипическую характеристику reREP-TIL, в первой и второй фазах размножения для 0,08% CD45RA⁺/CCR7⁻; 0,03% CD45RA⁺/CCR7⁺; 73,97% CD45RA⁻/CCR7⁻; и 25,91% CD45RA⁻/CCR7⁺ на день 14 после первого размножения, но до второго размножения. Пролиферация CM или EM TIL в повторном ReREP. Центральные клетки TIL памяти (CM) и эффекторные клетки TIL памяти (EM) были протестированы на их способность пролифероваться посредством повторного ReREP. Вкратце, $1,3 \times 10^6$ TIL после REP подвергали совместному культивированию с $1,3 \times 10^7$ PBMC-фидеров (CFSE-меченных), ОКТ3

(30 нг/мл) и rhIL-2 (3000 МЕ/мл), и культуру инкубировали в течение 14 дней. На 14-й день, центральные клетки TIL памяти и эффекторные клетки TIL памяти подвергали дискриминационному анализу на L/D Aqua⁻/CFSE⁻/TCR α / β ⁺/CD45RA⁻/CCR7⁺- и L/D Aqua⁻/CFSE⁻/TCR α / β ⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻-популяцию, соответственно, и анализировали путем клеточного сортирования на проточном цитометре. Чистота клеточной популяции составляла 97%. Затем, 1×10^4 CM или EM TIL, подвергнутых клеточному сортированию или не подвергнутых этому сортированию, культивировали с 1×10^6 РВМС-фидеров, ОКТ3 (30 нг/мл) и IL-2 (3000 МЕ/мл) с тремя повторностями в течение 7 дней. Клетки подсчитывали и регистрировали. Центральные клетки TIL памяти пролиферировались лучше, чем эффекторные клетки TIL памяти. Этот эксперимент был проведен авторами повторно с большим количеством линий TIL после REP.

[00116] **Фигура 10А и 10В:** Фенотипическая характеристика TIL во время ReREP. Клетки подвергали дискриминационному анализу на Aqua⁻/TCR α / β ⁺/CD4⁺ или CD8⁺ для определения фенотипа центральных клеток TIL памяти (CD45RA⁻CCR7⁺) или эффекторных клеток TIL памяти (CD45RA⁻CCR7⁻). t-критерий Стьюдента был использован для вычисления статистической значимости. *p<0,05, ns=незначимый.

[00117] **Фигура 11:** Репрезентативный схематический способ получения TIL, иногда называемый здесь способом 1С.

[00118] **Фигура 12:** Успешное размножение TIL, выделенных из опухолей, не являющихся меланомой. Данные представлены как распределение TIL (CD4⁺/CD8⁺) в опухолях, не являющихся меланомой.

[00119] **Фигура 13:** TIL, не являющиеся меланомой, экспрессировали CD27 и CD38, что соответствует молодым TIL.

[00120] **Фигура 14:** Активированные TIL имеют сдвиг в сторону популяции эффекторных клеток памяти.

[00121] **Фигура 15:** Фенотипы свежих TIL и reREP-TIL.

Подробное описание изобретения

I. Введение

[00122] Адоптивная клеточная терапия с использованием TIL, культивированных *ex vivo* в соответствии с протоколом быстрого размножения (REP), представляет собой успешно проведенную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии у пациентов-хозяев с меланомой. Параметры инфузии, применяемые в настоящее время, зависят от данных анализа композиции TIL (например, позитивных по CD28, CD8 или CD4), а также от кратности

размножения и жизнеспособности продукта REP.

[00123] Современные протоколы REP не дают полного представления о жизнеспособности TIL, которые должны быть введены пациенту путем инфузии. Т-клетки подвергаются сильному метаболическому сдвигу в процессе их созревания из «необученных» клеток в эффекторные Т-клетки (см., публикацию Chang, et al., *Nat. Immunol.* 2016, 17, 364, которая точно и во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки, и в которой, в частности, обсуждаются маркеры анаэробного и аэробного метаболизма). Так, например, «необученные» Т-клетки, в результате митохондриального дыхания продуцируют АТР, а зрелые здоровые эффекторные Т-клетки, такие как TIL, обладают в высокой степени гликолитическими свойствами в результате аэробного гликолиза, что позволяет получить биоэнергетические субстраты, необходимые для пролиферации, миграции и активации клеток, и обладающие противоопухолевой активностью.

[00124] В последних публикациях сообщалось, что лимитирующий гликолиз и стимулирующий митохондриальный метаболизм в TIL, перед их переносом, является желательным, поскольку клетки, функционирующие, главным образом, посредством гликолиза, будут иметь дефицит питательных веществ после адоптивного переноса, что будет приводить к гибели большинства перенесенных клеток. Таким образом, в литературе сообщается, что стимулирующий митохондриальный метаболизм может стимулировать более длительное выживание *in vivo*, и это факт был подтвержден с использованием ингибиторов гликолиза перед индуцированием иммунного ответа. См. Chang et al. (Chang, et al., *Nat. Immunol.* 2016, 17(364), 574-582).

[00125] В своих предпочтительных аспектах, настоящее изобретение относится к новым способам усовершенствования REP в соответствии с дополнительным протоколом рестимуляции, иногда называемым здесь «проколом быстрого размножения с рестимуляцией» или «reREP», который, как было неожиданно обнаружено приводит к размножению субпопуляций Т-клеток памяти, включая фенотипы центральных клеток памяти (CD45RA⁻CCR7⁺) или эффекторных клеток памяти (CD45RA⁻CCR7⁻), и/или к заметному усилению гликолитического дыхания по сравнению со свежесобранными TIL или оттаянными криоконсервированными TIL для рестимулированных TIL (иногда обозначаемых здесь «reTIL»). Таким образом, при проведении процедуры reREP (то есть, процедуры,

включающей первое размножение и второе размножение) на криоконсервированных TIL, пациенты могут получать в высокой степени метаболически активные и жизнеспособные TIL, что, в свою очередь, будет давать лучшие результаты.

[00126] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение также относится к способам оценки и количественной оценки такого улучшения метаболического дыхания. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам оценки относительной жизнеспособности популяции TIL путем проведения одной или более общих оценок метаболизма, включая, но не ограничиваясь ими, скорость и степень гликолиза, окислительного фосфорилирования, недостаточной дыхательной способности (SRC) и гликолитического резерва.

[00127] Кроме того, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение также относится к способам оценки и количественной оценки такого улучшения метаболического дыхания. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам оценки относительной жизнеспособности популяции TIL путем проведения одной или более общих оценок метаболизма, включая, но не ограничиваясь ими, скорость и степень гликолиза, окислительного фосфорилирования, недостаточной дыхательной способности (SRC) и гликолитического резерва.

[00128] Кроме того, необязательные дополнительные оценки включают, но не ограничиваются ими, оценки продуцирования АТФ, митохондриальной массы и поглощения глюкозы.

[00129] В некоторых случаях, популяцию reREP-клеток с повышенным метаболическим дыханием вводят пациенту путем инфузии, в основном, известными методами.

II. Определения

[00130] Используемый здесь термин «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты» или «TIL» означает популяцию клеток, которые, первоначально были получены как лейкоциты, покидающие кровотоки индивидуума и мигрирующие в опухоль. TIL являются, но не ограничиваются ими, цитотоксические CD8⁺-Т-клетки (лимфоциты), Th1- и Th17-CD4⁺-Т-клетки, природные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают первичные и вторичные TIL. «Первичные TIL» представляют собой клетки, взятые из образцов тканей пациента, описанных в настоящей заявке (иногда называемых «свежесобранными» клетками), а «вторичные TIL» представляют собой любые клеточные популяции TIL, которые были размножены или

подвергнуты пролиферации, как обсуждается в настоящей заявке, включая, но не ограничиваясь ими, общие TIL, размноженные TIL («REP-TIL»), а также «reREP-TIL», обсуждаемые в настоящей заявке.

[00131] В основном, TIL могут быть определены либо по их биохимическим свойствам с использованием маркеров клеточной поверхности, либо по их функциональным свойствам, либо по их способности инфильтрировать опухоли, либо по их терапевтическому эффекту. TIL могут быть, в основном, классифицированы по их экспрессии одного или более из нижеследующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно и альтернативно, TIL могут быть функционально определены по их способности инфильтрировать солидные опухоли после повторного введения пациенту. TIL могут быть также охарактеризованы по их активности, например, TIL могут считаться активными, если, например, высвобождение интерферона (IFN) превышает приблизительно 50 пг/мл, приблизительно 100 пг/мл, приблизительно 150 пг/мл, или приблизительно 200 пг/мл. Интерферон может включать интерферон гамма (IFN γ).

[00132] Используемый здесь термин «криоконсервированные TIL» означает, что первичные, общие или размноженные TIL (REP-TIL) были обработаны и хранились при температуре приблизительно от -150°C до -60°C . Общие методы криоконсервации также описаны в настоящей заявке, включая Примеры. Для ясности, «криоконсервированные TIL» отличаются от TIL замороженных образцов ткани, которые могут быть использованы как источник первичных TIL.

[00133] Используемый здесь термин «оттаянные криоконсервированные TIL» означает популяцию TIL, которые были ранее подвергнуты криоконсервации, а затем обработаны для доведения до комнатной температуры или более высокой температуры, включая, но не ограничиваясь ими, температуры культивирования клеток или температуры, при которых TIL могут быть введены пациенту.

[00134] Используемый здесь термин «популяция клеток» (включая TIL) означает число клеток, имеющих общие признаки. В основном, число популяций обычно составляет в пределах от 1×10^6 до 1×10^{10} , причем, различные популяции TIL отличаются по числу клеток. Так, например, начальное культивирование первичных TIL в присутствии IL-2 приводит к получению популяции общих TIL в

количестве приблизительно 1×10^8 клеток. Размножение посредством REP обычно дает популяции $1,5 \times 10^9$ – $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

[00135] Обычно, TIL сначала берут из образца опухоли пациента («первичные TIL»), а затем размножают с получением более крупной популяции для проведения последующих описанных здесь манипуляций, после чего подвергают криоконсервации, но необязательно, рестимуляции как описано в настоящей заявке, и необязательно, оценивают на фенотип или метаболические параметры, такие как индекс жизнеспособности TIL.

[00136] В основном, собранная клеточная суспензия называется «первичной клеточной популяцией» или популяцией «свежесобранных клеток».

[00137] В основном, как обсуждается в настоящей заявке, TIL сначала получают путем приготовления первичной популяции TIL, взятых из опухоли, вырезанной у пациента, как обсуждается в настоящей заявке («первичная клеточная популяция» или «первая клеточная популяция»). Затем проводят первое размножение общих клеток путем культивирования клеток с IL-2, в результате чего получают вторую популяцию клеток (иногда называемую здесь «общей популяцией TIL» или «второй популяцией»).

[00138] Термин «цитотоксический лимфоцит» включает цитотоксические Т-клетки (CTL) (включая цитотоксические CD8⁺-Т лимфоциты и CD4⁺-Т-хелперные лимфоциты), природные Т-клетки-киллеры (NKT) и природные клетки-киллеры (NK). Цитотоксическими лимфоцитами могут быть, например, α/β -TCR-позитивные Т-клетки, происходящие от периферической крови или α/β -TCR-позитивные Т-клетки, активированные опухолеспецифическими антигенами и/или трансдуцированные опухолеспецифическими химерными антигенными рецепторами или Т-клеточными рецепторами, и опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL).

[00139] Термин «центральные Т-клетки памяти» означает субпопуляцию Т-клеток, которые присутствуют у человека и представляют собой CD45RO⁺-клетки, которые конститутивно экспрессируют CCR7 (CCR7 hi) и CD62L (CD62 hi). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторами транскрипции для центральных Т-клеток памяти являются BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMII. Центральные Т-клетки памяти секретируют, главным образом, IL-2 и CD40L, как эффекторные молекулы после запуска TCR. Центральные Т-клетки памяти преобладают в CD4-компартементе крови, а у человека, они

встречаются в равных пропорциях в лимфоузлах и миндалинах.

[00140] Термин «эффекторные Т-клетки памяти» означает субпопуляцию человеческих Т-клеток или Т-клеток млекопитающих, которые, подобно центральным Т-клеткам памяти, являются CD45R0⁺-позитивными, но теряют свою способность конститутивно экспрессировать CCR7 (CCR7^{lo}) и являются гетерогенными или имеют низкий уровень экспрессии CD62L (CD62L^{lo}). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Фактором транскрипции для центральных Т-клеток памяти является BIMP1. Эффекторные Т-клетки памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после стимуляции антигенами, включая интерферон- γ , IL-4 и IL-5. Эффекторные Т-клетки памяти преобладают в CD8-компарimente крови и у человека присутствуют в равных пропорциях в легких, печени и кишечнике. Эффекторные CD8⁺-Т-клетки памяти несут большие количества перфорина. Термин «замкнутая система» означает систему, защищенную от внешнего воздействия окружающей среды. В способах согласно изобретению может быть использована любая замкнутая система, подходящая для проведения методов культивирования клеток. Замкнутыми системами являются, например, но не ограничиваются ими, закрытые G-контейнеры. После добавления сегмента опухоли в закрытую систему, эта система не подвергается внешнему воздействию до тех пор, пока TIL не будут введены пациенту.

[00141] Термины «мононуклеарные клетки периферической крови» и «PBMC» означают клетки периферической крови, имеющие круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, NK-клетки) и моноциты. Предпочтительно, мононуклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

[00142] Термин «быстрое размножение» означает увеличение числа антигенспецифических TIL по меньшей мере приблизительно в 3 раза (или в 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) за одну неделю, а более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 10 раз (или в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или в 90 раз) за одну неделю, или наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 100 раз за одну неделю. Число протоколов быстрого размножения описано в настоящей заявке.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению также включают стадию «pre-REP»,

где опухолевую ткань или клетки опухолевой ткани культивируют в стандартной лабораторной среде (включая, но не ограничиваясь ею, RPMI) и обрабатывают такими реагентами, как облученные клетки-фидеры и анти-CD3 антитела для достижения желаемого эффекта, такого как увеличение числа TIL и/или обогащение популяцией клеток, содержащих нужные маркеры клеточной поверхности, или сообщение других структурных, биохимических или функциональных признаков. В стадии pre-REP могут быть использованы лабораторные реактивы высокой чистоты (исходя из предположения, что лабораторные реактивы высокой чистоты будут разведены в последующей стадии REP), что позволит облегчить включение альтернативных стратегий для повышения уровня продуцирования TIL. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, раскрытые здесь агонист и/или пептид или пептидомиметик TLR могут быть включены в культуральную среду во время проведения pre-REP. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культура pre-REP может включать IL-2.

[00144] В своих предпочтительных аспектах, настоящее изобретение относится к новым способам усовершенствования REP в соответствии с дополнительным протоколом рестимуляции, иногда называемым здесь «проколом быстрого размножения с рестимуляцией» или «reREP», который, как было неожиданно обнаружено, приводил к размножению субпопуляций Т-клеток памяти, включая субпопуляцию эффекторных Т-клеток памяти, и/или к заметному усилению гликолитического дыхания по сравнению со свежесобранными TIL или оттаянными криоконсервированными TIL для рестимулированных TIL (иногда обозначаемых здесь «reTIL»). Таким образом, при проведении процедуры reREP на криоконсервированных TIL, пациенты могут получать в высокой степени метаболически активные и жизнеспособные TIL, что, в свою очередь, будет давать лучшие результаты. Такие протоколы рестимуляции, также называемые здесь дополнительными «размножениями» клеточных популяций, более подробно описаны далее.

[00145] Термины «фрагментация», «фрагмент» и «фрагментированный» используются здесь для описания способов разрушения опухоли, включая методы механической фрагментации, такие как измельчение, вырезание, разделение и частичное удаление тканей опухоли, а также любой другой метод разрушения физической структуры опухолевой ткани. Термин «*in vivo*» означает событие, которое наблюдается в организме индивидуума.

[00146] Термин «*in vitro*» означает событие, которое происходит за пределами организма индивидуума. *In vitro* анализы включают клеточные анализы, в которых используются живые или погибшие клетки, и могут включать бесклеточный анализ, в котором не используются интактные клетки.

[00147] Термин «анти-CD3 антитело» означает антитело или его вариант, например, моноклональное антитело, включая человеческие, гуманизованные, химерные или мышинные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Анти-CD3 антителами являются антитело ОКТ-3, также известное как муромонаб, и УСНТ-1. Другими анти-CD3 антителами являются, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

[00148] Термин «ОКТ-3» (также обозначаемый здесь «ОКТ3») означает моноклональное антитело или его биологический аналог или вариант, включая человеческие, гуманизованные, химерные или мышинные антитела, направленные против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и этот термин включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл чистого MACS GMP CD3, Miltenyi Biotec, Inc., San Diego, CA, USA) и муромонаб или его варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или их биологические аналоги. Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей муромонаба представлены в Таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, была депонирована в Американской коллекции типовых культур под регистрационным номером ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, была также депонирована в Европейской коллекции аутентичных клеточных культур (ECACC) под каталожным номером No. 86022706. Таблица 1. Аминокислотные последовательности муромонаба.

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

	KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPA I MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYF KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00149] Термин «IL-2» (также обозначаемый здесь «IL2») означает фактор роста Т-клеток, известный как интерлейкин-2, и все формы IL-2, включая человеческие формы, формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или их биологические аналоги и варианты. IL-2 описан, например, в публикациях Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79, описание которых вводятся в настоящее описание посредством ссылки. Аминокислотные последовательности рекомбинантного человеческого IL-2, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлены в таблице 2 (SEQ ID NO:3). Так, например, термин IL-2 охватывает человеческие рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (ПРОЛЕЙКИН, коммерчески доступный и поставляемый многими поставщиками в объеме 22 миллиона МЕ на один используемый сосуд), а также форму рекомбинантного IL-2, поставляемого поставщиками CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b), и другие коммерческие эквиваленты, поставляемые другими поставщиками. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125, человеческий IL-2) представляет собой негликозилированный человеческий рекомбинантный IL-2 с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлена в таблице 2 (SEQ ID NO:4). Термин IL-2 также охватывает ПЭГилированные формы IL-2, описанные в настоящей заявке, включая ПЭГилированное IL2-пролекарство NKTR-214, поставляемое Nektar Therapeutics, South

San Francisco, CA, USA. NKTR-214, и ПЭГилированный IL-2, подходящие для их использования в настоящем изобретении и описанные в публикации заявки на патент США No. US 2014/0328791 A1 и в публикации Международной патентной заявки No. WO 2012/065086 A1, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для использования в настоящем изобретении, описаны в патентах США NN. 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. Препараты IL-2, подходящие для их использования в настоящем изобретении, описаны в патенте США No. 6706289, содержание которого вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

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

IL-21 (rhIL-21)	KSLIQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132
-----------------	-------------------------------------

[00150] Термин «IL-4» (также обозначаемый здесь «IL4») означает цитокин, известный как интерлейкин 4, который продуцируется Th2-Т-клетками и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку «необученных» Т-клеток-хелперов (Th0-клеток) в Th2-Т-клетки. Steinke & Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. После активации под действием IL-4, Th2-Т-клетки продуцируют дополнительное количество IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II и индуцирует переключение экспрессии изотипов на IgE и IgG1 В-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для его использования в настоящем изобретении, является коммерчески доступным и поставляется многими поставщиками, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-15, Cat. No. Gibco CTR0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлена в Таблице 2 (SEQ ID NO:5).

[00151] Термин «IL-7» (также обозначаемый здесь «IL7») означает гликозилированный цитокин, происходящий от ткани и известный как интерлейкин 7, который может быть выделен из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, *Blood* 2002, 99, 3892-904. IL-7 может стимулировать рост Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором IL-7, то есть, с гетеродимером, состоящим из рецептора IL-7 альфа и общего рецептора цепи-гамма, которые генерируют последовательность сигналов, имеющих важное значение для роста Т-клеток в тимусе и их выживание в периферических органах. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для его использования в настоящем изобретении, является коммерчески доступным и поставляется многими поставщиками, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-15, Cat. No. Gibco PHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлена в Таблице 2 (SEQ ID NO:6).

[00152] Термин «IL-15» (также обозначаемый здесь «IL15») означает фактор роста Т-клеток, известный как интерлейкин-15, и все формы IL-2, включая человеческие формы и формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или их биологические аналоги и варианты. IL-15 описан, например, в публикациях Fehniger & Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. IL-15, как и IL-2, имеет общие субъединицы рецептора передачи сигнала β и γ . Рекомбинантный человеческий IL-15 представляет собой одну негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-15 является коммерчески доступным и поставляется многими поставщиками, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-15, Cat. No. 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-15, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлена в Таблице 2 (SEQ ID NO:7).

[00153] Термин «IL-21» (также обозначаемый здесь «IL21») означает плеiotропный белок цитокин, известный как интерлейкин-21, и все формы IL-21, включая человеческие формы и формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы или их биологические аналоги и варианты. IL-21 описан, например, в публикации Spolski & Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95, содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки. IL-21 продуцируется, главным образом, природными Т-клетками-киллерами и активированными человеческими CD4⁺-Т-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-21 представляет собой одну негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-21 является коммерчески доступным и поставляется многими поставщиками, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-21, Cat. No. 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-21, подходящего для его использования в настоящем изобретении, представлена в Таблице 2 (SEQ ID NO:8).

[00154] Если указано «противоопухолевое эффективное количество», «опухоль-ингибирующее эффективное количество» или «терапевтическое количество», то точное количество вводимых композиций согласно изобретению может быть определено врачом с учетом различных особенностей индивидуума, включая возраст, массу тела, размер опухоли, степень инфицирования или количество метастазов и состояние пациента (индивидуума). По существу, установлено, что фармацевтическая композиция, содержащая описанные здесь генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, может быть введена в дозе 10^4 - 10^{11} клеток/кг массы тела (например, 10^5 - 10^6 , 10^5 - 10^{10} , 10^5 - 10^{11} , 10^6 - 10^{10} , 10^6 - 10^{11} , 10^7 - 10^{11} , 10^7 - 10^{10} , 10^8 - 10^{11} , 10^8 - 10^{10} , 10^9 - 10^{11} или 10^9 - 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целые значения в этих интервалах. Композиции генетически модифицированных цитотоксических лимфоцитов могут быть введены несколько раз в этих дозах. Генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты могут быть введены методами инфузии, известными специалистам в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Оптимальная доза и курс лечения конкретного пациента могут быть легко определены специалистом-медиком путем обследования пациента на признаки заболевания и соответствующей коррекции курса лечения.

[00155] Термин «злокачественное заболевание кроветворной системы» означает рак и опухоли гемопоэтических и лимфоидных тканей, включая, но не ограничиваясь ими, ткани крови, костного мозга, лимфоузлов и лимфатической системы. Злокачественное заболевание кроветворной системы также называется «жидкими опухолями». Злокачественными заболеваниями кроветворной системы являются, но не ограничиваются ими, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническая лимфоцитарная лимфома (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМЛ), ходжкинская лимфома и неходжкинская лимфома. Термин «злокачественное заболевание В-клеток кроветворной системы» означает злокачественные заболевания кроветворной системы, поражающие В-клетки.

[00156] Термин «солидная опухоль» означает аномальную массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная раковая опухоль» означает

злокачественные солидные опухоли, новообразования или раковые солидные опухоли. Солидными раковыми опухолями являются, но не ограничиваются ими, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легких, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, между которыми рассеиваются раковые клетки, и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00157] Термин «жидкая опухоль» означает аномальную массу клеток, которые являются жидкими по своей природе. Жидкими раковыми опухолями являются, но не ограничиваются ими, лейкозы, миеломы и лимфомы, а также другие злокачественные заболевания кроветворной системы. TIL, выделенные из жидких опухолей, могут также называться здесь мозг-инфильтрирующими лимфоцитами (MIL).

[00158] Используемый здесь термин «микроокружение» может означать микроокружение солидной опухоли или опухоли кроветворной системы в целом или отдельную субпопуляцию клеток в этом микроокружении. Используемый здесь термин микроокружение опухоли означает комплексную смесь «клеток, растворимых факторов, молекул передачи сигнала, внеклеточных матриц и механических признаков, которые стимулируют трансформацию новообразований, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, сообщают резистентность к терапии и создают нишу, благоприятствующую развитию доминантных метастазов» как описано Swartz, et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, однако, клиренс опухоли под действием иммунной системы встречается редко из-за подавления иммунной системы этим микроокружением.

[00159] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение включает способ лечения рака с использованием популяции rTIL, где пациент ранее проходил лечение с применением не-миелоабляционной химиотерапии перед инфузией rTIL согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция rTIL может быть обеспечена с использованием популяции eTils, где пациент ранее проходил лечение с применением не-миелоабляционной химиотерапии перед инфузией rTIL и eTil согласно изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретения, не-миелоабляционная химиотерапия включает введение

циклофосамида в количестве 60 мг/кг/день в течение 2 дней (за 27 и 26 дней до инфузии rTIL) и флударабина в количестве 25 мг/м²/день в течение 5 дней (за 27-23 дня до инфузии rTIL). В одном из вариантов осуществления изобретения, после немиелоабляционной химиотерапии и инфузии rTIL (на день 0) согласно изобретению, пациенту внутривенно вводят IL-2 в дозе 720000 МЕ/кг через каждые 8 часов для сообщения физиологической толерантности.

[00160] Данные эксперимента показали, что истощение лимфосистемы до адаптивного переноса опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности терапии благодаря элиминации регуляторных Т-клеток и конкуренции элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения проводится стадия истощения лимфосистемы (иногда также называемая «иммуносупрессорное кондиционирование») у пациента перед введением ему rTIL согласно изобретению.

[00161] Используемые здесь термины «совместное введение», «совместное применение», «вводимые в комбинации с...», «введение в комбинации с...», «одновременное введение» и «конкурентное введение» включают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления изобретения, например, по меньшей мере одного агониста калиевого канала в комбинации с множеством TIL) индивидууму так, чтобы активные фармацевтические ингредиенты и/или их метаболиты были введены индивидууму в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение отдельных композиций, введение отдельных композиций в различные периоды времени или введение композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Предпочтительным является одновременное введение отдельных композиций и введение композиции, в которой присутствуют оба агента.

[00162] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» означает количество соединения или комбинации описанных здесь соединений, достаточное для достижения нужного эффекта их введения, включая, но не ограничиваясь ими, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от цели его применения (*in vitro* или *in vivo*) или от особенностей

индивидуума и типа заболевания, подвергаемого лечению (например, от массы тела, возраста и пола индивидуума), тяжести патологического состояния или способа введения. Этот термин также означает дозу, которая будет индуцировать конкретный ответ в клетках-мишенях (например, снижение уровня адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретно выбранных соединений, схемы введения доз, независимо от того, вводится ли это соединение отдельно или в комбинации с другими соединениями, а также от времени введения, ткани, в которую вводят такое соединение, и физической системы доставки, в которой присутствует такое соединение.

[00163] Термины «терапия», «лечение», «лечить» и т.п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Такой эффект может быть профилактическим с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома, и/или он может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или устранения побочного эффекта, ассоциированного с таким заболеванием. Используемый здесь термин «лечение» охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, а в частности, у человека, и включает: (а) профилактику заболевания у индивидуума, который может быть предрасположен к развитию заболевания, но у которого это заболевание еще не было диагностировано; (b) подавление заболевания, то есть, прекращение его развития или прогрессирувания; и (с) ослабление симптомов заболевания, то есть, регрессию заболевания и/или ослабление одного или более симптомов заболевания. Термин «лечение» также означает доставку агента для достижения фармакологического эффекта даже в отсутствие заболевания или состояния. Так, например, термин «лечение» охватывает доставку композиции, которая может вырабатывать иммунный ответ или сообщать иммунитет в отсутствие патологического состояния, например, в случае введения вакцины.

[00164] Термин «гетерологичный», если он относится к частям нуклеиновой кислоты или белка, означает, что нуклеиновая кислота или белок содержат две или более подпоследовательностей, которые не связаны друг с другом в природе. Так, например, нуклеиновой кислотой обычно является рекомбинантно продуцированная нуклеиновая кислота, имеющая две или более последовательности неродственных генов, расположенных так, чтобы они образовывали

новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промотор от одного источника и кодирующую область от другого источника, или кодирующие области от различных источников. Аналогичным образом, термин «гетерологичный белок» означает, что этот белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не связаны друг с другом в природе (например, гибридный белок).

[00165] Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «99% идентичность»), если они относятся к двум или более нуклеиновым кислотам или полипептидам, означают, что две или более последовательностей или подпоследовательностей являются одинаковыми или имеют одинаковый процент идентичных нуклеотидов или аминокислотных остатков при сравнении и выравнивании (введении пробелов, если это необходимо) на максимальное соответствие без учета каких-либо консервативных аминокислотных замен в процессе оценки идентичности последовательностей. Процент идентичности может быть определен с использованием компьютерной программы или алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуальной оценки. Для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей могут быть использованы различные алгоритмы и компьютерные программы, известные специалистам. Подходящими программами для определения процента идентичности последовательностей являются, например, пакет программ BLAST, имеющийся на web-сайте BLAST Национального Центра Биотехнологической Информации Правительства США. Сравнение двух последовательностей может быть осуществлено с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновой кислоты, а BLASTP используется для сравнения аминокислотных последовательностей. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или MegAlign, поставляемые от DNASTAR, представляют собой другие общедоступные компьютерные программы, которые могут быть использованы для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области может определить соответствующие параметры максимального выравнивания с использованием конкретной компьютерной программы для выравнивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения используются параметры по умолчанию компьютерной программы для выравнивания.

[00166] Используемый здесь термин «вариант» охватывает, но не ограничивается ими, антитела или гибридные белки, которые содержат аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности эталонного антитела одной или более заменами, делециями и/или добавлениями в определенных положениях, находящихся в аминокислотной последовательности эталонного антитела или смежных с этой аминокислотной последовательностью. Вариант может включать одну или более консервативных замен в аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью эталонного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену на одинаково заряженные или незаряженные аминокислоты. Этот вариант сохраняет свою способность специфически связываться с антигеном для эталонного антитела. Термин «вариант» также включает ПЭГилированные антитела или белки.

[00167] Термин «*in vivo*» означает событие, которое наблюдается в организме индивидуума.

[00168] Термин «*in vitro*» означает событие, которое происходит за пределами организма индивидуума. *In vitro* анализы включают клеточные анализы, в которых используются живые или погибшие клетки, и могут включать бесклеточный анализ, в котором не используются интактные клетки.

[00169] Термин «быстрое размножение» означает увеличение числа антигенспецифических TIL по меньшей мере приблизительно в 3 раза (или в 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) за одну неделю, а более предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 10 раз (или в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или в 90 раз) за одну неделю, или наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 100 раз за одну неделю. Ряд протоколов быстрого размножения описан в настоящей заявке.

III. Рестимуляция криоконсервированных TIL

[00170] Как обсуждалось в настоящем описании, настоящее изобретение относится к рестимуляции криоконсервированных TIL в целях повышения их метаболической активности и относительной жизнеспособности перед их трансплантацией пациенту, и к способам тестирования указанного метаболического дыхания. Как, в основном, обсуждается в настоящей заявке, TIL обычно берут из образца пациента и подвергают манипуляции для размножения этих TIL перед их трансплантацией пациенту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты, но

необязательно, генетической манипуляции, как обсуждается ниже, а затем криоконсервации. После оттаивания, эти клетки подвергают рестимуляции для повышения их метаболизма перед инфузией пациенту.

[00171] Описание «стадий» А, В, С и т.п. приводится ниже со ссылкой на фигуру 11. Порядок проведения стадий описан ниже, а на фигуре 11 представлены любые возможные комбинации или стадии в любой очередности, а также рассматриваются дополнительные стадии, повторяющиеся стадии и/или отсутствующие стадии, и описанные здесь способы.

А. Стадия А: Взятие образца опухоли у пациента

[00172] Обычно, TIL сначала берут из образца опухоли пациента («первичные TIL»), а затем размножают с получением более крупной популяции для проведения последующих описанных здесь манипуляций, после чего подвергают криоконсервации, но необязательно, рестимуляции как описано в настоящей заявке, и оценивают, но необязательно, на фенотип и метаболические параметры, такие как индекс жизнеспособности TIL.

[00173] Образец опухоли пациента может быть получен известными методами, обычно путем хирургической операции, пункционной биопсии или другими способами получения образца, содержащего смесь опухолевых клеток и клеток TIL. Обычно образец опухоли может происходить от любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастазирующие опухоли. Образец опухоли может также представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, вызываемую злокачественным заболеванием кровеносной системы. Сольной опухолью может быть любая раковая опухоль, включая, но не ограничиваясь ими, опухоль молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, прямой и ободочной кишки, легких, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая, но не ограничиваясь ими, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления изобретения, подходящие TIL получают из злокачественных опухолей меланомы, поскольку сообщалось, что эти опухоли имеют очень высокие уровни TIL.

[00174] Термин «солидная опухоль» означает аномальную массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Сольные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная раковая опухоль» означает

злокачественные солидные опухоли, новообразования или раковые солидные опухоли. Солидными раковыми опухолями являются, но не ограничиваются ими, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легких, рак молочной железы, рак молочной железы, негативный по трем признакам, рак предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рак выбран из группы, состоящей из рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы, негативного по трем признакам, и немелкоклеточной карциномы легких. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, между которыми рассеиваются раковые клетки, и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00175] Термин «злокачественное заболевание кроветворной системы» означает рак и опухоли гемопозитических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, ткани крови, костного мозга, лимфоузлов и лимфатической системы. Злокачественные заболевания кроветворной системы также называются «жидкими опухолями». Злокачественными заболеваниями кроветворной системы являются, но не ограничиваются ими, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническая лимфоцитарная лимфома (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМЛ), ходжкинская лимфома и неходжкинская лимфома. Термин «злокачественное заболевание В-клеток кроветворной системы» означает злокачественные заболевания кроветворной системы, поражающие В-клетки.

[00176] Образец опухоли, после его получения, обычно фрагментируют путем разрезания острой бритвой на мелкие кусочки размером от 1 до приблизительно 8 мм³, а особенно подходящими являются кусочки размером приблизительно 2-3 мм³. TIL культивируют из этих фрагментов с использованием ферментативных гидролизатов опухоли. Такие гидролизаты опухоли могут быть получены путем инкубирования в ферментативной среде (например, в буфере 1640, Roswell Park Memorial Institute (RPMI), содержащем 2 mM глутамата, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, с использованием устройства для диссоциации ткани).

Гидролизаты опухоли могут быть получены путем помещения опухоли в ферментативную среду и механической диссоциации опухоли приблизительно в течение 1 минуты с последующим инкубированием в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂ и проведением повторных циклов механической диссоциации и инкубирования в вышеуказанных условиях до тех пор, пока не оставались лишь небольшие кусочки ткани. По окончании этой процедуры, если клеточная суспензия содержала большое количество эритроцитов или погибших клеток, то для удаления этих клеток может быть проведена процедура разделения в градиенте плотности с использованием фиколла, то есть, разветвленного гидрофильного полисахарида. При этом, могут быть применены и альтернативные методы, такие как методы, описанные в публикации заявки на патент США No. 2012/0244133 A1, содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки. Любой из вышеописанных методов может быть применен в любых описанных здесь вариантах осуществления изобретения, относящихся к способам размножения TIL или к способам лечения рака.

[00177] В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментация включает физическую фрагментацию, например, разрушение, а также гидролиз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацией является физическая фрагментация. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацией является разрушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацию осуществляют путем гидролиза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть сначала культивированы из ферментативных гидролизатов опухоли и фрагментов опухоли, взятых у пациентов.

[00178] В некоторых вариантах осуществления изобретения, если опухолью является солидная опухоль, то такую опухоль подвергают физической фрагментации после взятия образца опухоли, например, как описано в стадии А на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацию осуществляют до криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацию осуществляют после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагментацию осуществляют после взятия опухоли и в отсутствие любой криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль фрагментируют, и 2, 3 или 4 фрагмента или кусочка помещают в каждый контейнер для первого размножения. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль фрагментируют, и 3 или 4 фрагмента или кусочка помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, опухоль фрагментируют, и 4 фрагмента или кусочка помещают в каждый контейнер для первого размножения.

[00179] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли получают путем разрезания острой бритвой. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно от 1 мм³ до 10 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно от 1 мм³ до 8 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 1 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 2 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 3 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 4 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 5 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 6 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 7 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 8 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 9 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно 10 мм³.

[00180] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL получают из гидролизатов опухоли. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гидролизаты опухоли получают путем инкубирования в ферментативной среде, включая, например, но не ограничиваясь ею, RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). После помещения опухоли в ферментативную среду, опухоль может быть подвергнута механической диссоциации приблизительно в течение 1 минуты. Заемт раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, после чего его

снова механически разрушают приблизительно в течение 1 минуты. После повторного инкубирования в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, опухоль может быть подвергнута механическому разрушению в третий раз приблизительно в течение 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления изобретения, после третьего механического разрушения, если присутствовали крупные кусочки ткани, то образец подвергали 1 или 2 дополнительным механическим диссоциациям с дополнительным инкубированием в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂ или без инкубирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по окончании последнего инкубирования, если клеточная суспензия содержала большое количество эритроцитов или погибших клеток, то для удаления этих клеток может быть проведена процедура разделения в градиенте плотности с использованием фиколла.

[00181] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная суспензия, собранная до первой стадии размножения, называется «первичной клеточной популяцией» или «популяцией свежесобранных клеток».

[00182] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки могут быть, но необязательно, заморожены после сбора образца и могут храниться в замороженном виде до начала проведения стадии В, более подробно описанной ниже.

В. Стадия В: Первое размножение

[00183] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL (также называемое первым размножением или первым размножением TIL) может быть осуществлено путем проведения первой стадии размножения общих TIL (например, в Стадии В, как показано на фигуре 11, или в стадии первого размножения; эта стадия может включать стадию размножения, обозначаемую preREP), как описано в настоящей заявке, а затем, стадии второго размножения (например, Стадии D, как показано на фигуре 11; эта стадия может включать стадию размножения, называемую стадией быстрого размножения (REP)), как описано в настоящей заявке, с последующей необязательной криоконсервацией (например, после стадии D как показано на фигуре 11), и дополнительным вторым размножением (например, во второй стадии D, как показано на фигуре 11, которая может включать стадию, иногда называемую стадией REP с рестимуляцией) как описано в настоящей заявке. TIL, полученные этим способом, могут быть, но необязательно, охарактеризованы на фенотипические свойства и

метаболические параметры, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL замораживают (то есть, подвергают криоконсервации) после первого размножения (например, в стадии В, как показано на фигуре 11) и хранят до проведения фенотипического отбора, а затем оттаивают до проведения одной или более стадий второго размножения (например, одного или более размножений в соответствии со стадией D, как показано на фигуре 11).

[00184] В некоторых вариантах осуществления изобретения, если клетки замораживают после их выделения из образца опухоли (например, во время Стадии А, как показано на фигуре 11), то эти клетки оттаивают до первого размножения (например, в Стадии В, как показано на фигуре 11).

[00185] В тех вариантах осуществления изобретения, в которых культивирование TIL начинают в 24-луночных планшетах, например, с использованием набора 24-луночных планшетов для культивирования клеток Costar, то в каждую лунку плоскодонного планшета (Corning In corporation, Corning, NY) может быть засеяно 1×10^6 клеток опухолевого гидролизата или один фрагмент опухоли в 2 мл полной среды (CM) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, фрагмент опухоли имеет размер приблизительно от 1 мм³ до 10 мм³.

[00186] После приготовления опухолевых фрагментов, полученные клетки (то есть, фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей IL-2 в условиях, благоприятствующих росту TIL по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гидролизаты опухоли инкубируют в 2 мл-лунках в среде, содержащей инактивированную человеческую сыворотку АВ (или, в некоторых случаях, как описано в настоящей заявке, в присутствии популяции клеток aAPC) с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение нескольких дней, а обычно от 10 до 14 дней с получением популяции общих TIL, обычно приблизительно 1×10^8 общих клеток TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда во время первого размножения содержит IL-2 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IL представляет собой рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 20-30 $\times 10^6$

МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 20×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 25×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 30×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $4-8 \times 10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $5-7 \times 10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 получают как описано в Примере 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 10000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 9000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 7000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2 или приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 9000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 8000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 7000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда также содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл,

приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или 8000 МЕ/мл IL-2.

[00187] В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения обозначается «СМ», в соответствии с аббревиатурой, принятой для культуральной среды. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта среда обозначается СМ1 (культуральная среда 1). В некоторых вариантах осуществления изобретения, СМ состоит из среды RPMI 1640 с GlutaMAX, в которую были добавлены 10% человеческая сыворотка АВ, 25 мМ Нерес и 10 мг/мл гентамицина. В тех вариантах осуществления изобретения, где культивирование осуществляют в газопроницаемых колбах с емкостью 40 мл и с газопроницаемым силиконовым дном размером 10 см² (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (фиг. 1), в каждую колбу загружают $10-40 \times 10^6$ жизнеспособных клеток опухолевого гидролизата или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл СМ с IL-2. G-Rex10 и 24-луночные планшеты инкубируют в инкубаторе с повышенной влажностью при 37°C в 5% CO₂, и через 5 дней после начала культивирования, половину среды удаляют и заменяют свежей СМ и IL-2, а еще через 5 дней, половину среды заменяют через каждые 2-3 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, СМ представляет собой СМ1, описанную в Примерах, см., Пример 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение осуществляют в исходной клеточной культуральной среде или в первой клеточной культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления изобретения, исходная клеточная культуральная среда или первая клеточная культуральная среда содержит IL-2.

[00188] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней или 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 11 дней - 21 дня. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 12 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 13 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 14 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 15 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 16 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 17 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 18 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 19 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 20 дней - 21 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение TIL может быть осуществлено в течение 21 дня.

С. Стадия С: Переход от первого размножения ко второму размножению

[00189] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL, полученные при первом размножении (например, в Стадии В, как показано на Фигуре 11), хранят до проведения фенотипического отбора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL, полученные при первом размножении, подвергают криоконсервации после первого размножения и до второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации в процессе перехода от первого размножения ко второму размножению. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации после Стадии В и до Стадии D, как показано на Фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации и оттаивают в процессе перехода от первого размножения ко второму размножению. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации после Стадии В, а затем оттаивают до проведения стадии D (как показано на Фигуре 11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко

второму размножению осуществляют приблизительно за 22 дня, 23 дня, 24 дня, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней или 30 дней при фрагментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко второму размножению осуществляют приблизительно за 22 дня - 30 дней при фрагментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко второму размножению осуществляют приблизительно за 24 дня - 30 дней при фрагментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко второму размножению осуществляют приблизительно за 26 дней - 30 дней при фрагментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко второму размножению осуществляют приблизительно за 28 дней - 30 дней при фрагментации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, переход от первого размножения ко второму размножению осуществляют приблизительно за 30 дней при фрагментации.

D. Стадия D: Второе размножение

[00190] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение или второе размножение TIL (которое может включать размножения, иногда обозначаемые REP) может быть осуществлено с использованием любых колб или контейнеров для TIL, известных специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено за 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня или 22 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено приблизительно за 14 дней - 22 дня. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено приблизительно за 14 дней - 20 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено приблизительно за 14 дней - 18 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено приблизительно за 14 дней - 16 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL может быть осуществлено приблизительно за 14 дней.

[00191] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение осуществляют в добавленной клеточной культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, добавленная клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки-фидеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (АРС; также называемые антигенпрезентирующими клетками-фидерами).

[00192] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL (которое может включать размножение, обозначаемое REP) может быть осуществлено с использованием колб T-175 и газопроницаемых пакетов, описанных ранее (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, *J Immunother.*, 31:742-751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, *J Immunother.*, 26:332-342) или газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение осуществляют с использованием колб. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение осуществляют с использованием газопроницаемых колб G-Rex. Для TIL, второе размножение осуществляют в колбах T-175, и в этом случае, приблизительно 1×10^6 TIL суспендируют приблизительно в 150 мл среды, и эту среду добавляют в каждую колбу T-175. TIL культивируют с облученными (50 Грей) аллогенными РВМС в качестве клеток-«фидеров» в отношении 1:100, и эти клетки культивируют в 1:1-смеси среды CM и AIM-V (среды 50/50), в которую были добавлены 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 антитела. Колбы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения, половину среды заменяют через 5 дней и проводят второе размножение с использованием среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, на день 7, клетки из 2 колб T-175 объединяют в 3-литровом пакете и к 300 мл суспензии TIL добавляют 300 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ/мл IL-2. Число клеток в каждом пакете может быть подсчитано каждый день или через два дня, а свежая среда может быть добавлена для поддержания числа клеток в количестве приблизительно от 0,5 до приблизительно $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[00193] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL (которое может включать размножение, обозначаемое REP) может быть осуществлено в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл и с газопроницаемым силиконовым дном размером 100 см² (G-Rex 100, поставляемой Wilson Wolf

Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA) (фиг. 1), где приблизительно 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с облученными аллогенными РВМС в отношении 1:100 в 400 мл среды 50/50, в которую были добавлены 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ3). Колбы G-Rex100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления изобретения, за 5 дней до второго размножения, 250 мл супернатанта удаляют и помещают в центрифужные бутылки, а затем центрифугируют при 1500 об/мин (491× g) в течение 10 минут. Затем осадок TIL может быть ресуспендирован со 150 мл свежей среды с 5% человеческой сывороткой АВ, 3000 МЕ на мл IL-2, и снова добавлен в исходные колбы G-Rex100. В тех вариантах осуществления изобретения, в которых TIL серийно размножают в колбах G-Rex100, на день 7, TIL в каждой G-Rex100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и клеточную суспензию разделяют на три 100 мл-аликвоты, которые могут быть использованы для посева в три колбы G-Rex100. Затем, в каждую колбу добавляют 150 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ на мл IL-2. Колбы G-Rex100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂, и через 4 дня после второго размножения, в каждую колбу G-Rex100 может быть добавлено 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки собирают на 14-й день культивирования.

[00194] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL (которое может включать размножение, обозначаемое REP) может быть осуществлено в газопроницаемом контейнере. Так, например, TIL могут быть быстро размножены с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточным рецептором в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). В одном из вариантов осуществления изобретения, при размножении ряда клеток TIL используется приблизительно от 1×10^9 до приблизительно 1×10^{11} антигенпрезентирующих клеток-фидеров. Неспецифическим стимулятором Т-клеточного рецептора может быть, например, приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, то есть, мышиноного моноклонального анти-CD3 антитела (поставляемого от Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotec, Auburn, CA). TIL могут быть быстро размножены с последующей стимуляцией TIL *in vitro* одним или более антигенами, включая их антигенные части, такие как эпитоп(ы) раковой опухоли, которые могут быть, но необязательно, экспрессированы из вектора, например, пептид,

связывающийся с человеческим лейкоцитарным антигеном А2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 л) или gr1 00:209-217 (210М), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другими подходящими антигенами могут быть, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназа, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. TIL могут быть также быстро размножены путем рестимуляции тем же самым (теми же самыми) антигеном(ами) раковой опухоли, которые были введены путем импульсного мечения в HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. Альтернативно, TIL могут быть затем рестимулированы, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными аллогенными HLA-A2⁺-лимфоцитами и IL-2.

[00195] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение TIL (которое может включать размножение, обозначаемое REP) может быть осуществлено в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл и с газопроницаемым силиконовым дном размером 100 см (G-Rex 100, поставляемой Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), где 5×10^6 или 10×10^6 TIL могут быть культивированы с aAPC в отношении 1:100 в 400 мл среды 50/50, в которую были добавлены 5% человеческая сыворотка АВ, 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ3). Колбы G-Rex100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂. На день 5, 250 мл супернатанта может быть удалено и помещено в центрифужные бутылки с последующим центрифугированием при 1500 об/мин (491× g) в течение 10 минут. Осадок TIL может быть ресуспендирован со 150 мл свежей среды с 5% человеческой сывороткой АВ, 3000 МЕ на мл IL-2, и снова добавлен в исходные колбы G-Rex100. Если TIL серийно размножают в колбах G-Rex100, то на день 7, TIL в каждой колбе G-Rex100 могут быть суспендированы в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, а клеточная суспензия может быть разделена на три 100 мл-аликвоты, которые могут быть использованы для посева в 3 колбы G-Rex100. Затем, в каждую колбу может быть добавлено 150 мл AIM-V с 5% человеческой сывороткой АВ и 3000 МЕ на мл IL-2. Колбы G-Rex100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO₂, и через 4 дня, в каждую колбу G-Rex100 может быть добавлено 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл IL-2. Клетки могут быть собраны на 14-й день культивирования.

[00196] В одном из вариантов осуществления изобретения,

второе размножение (включая размножение, обозначаемое REF) осуществляют в колбах с общими TIL, смешанными со 100- или 200-кратным избытком инактивированных клеток-фидеров, 30 мг/мл анти-CD3 антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл-среды. Замену среды осуществляют (обычно 2/3 среды заменяют путем впрыска свежей среды) до тех пор, пока клетки не будут перенесены в альтернативную камеру для роста. Альтернативными камерами для роста являются колбы GRex и газопроницаемые контейнеры, более подробно обсуждаемые ниже.

[00197] В другом варианте осуществления изобретения проводят второе размножение (включая размножение, обозначаемое REF), и это размножение также включает стадию отбора TIL на наивысшую опухолевую реактивность. При этом может быть применен любой метод отбора, известный специалистам. Так, например, методы, описанные в публикации заявки на патент США No. 2016/0010058 A1, содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки, могут быть применены для отбора TIL на наивысшую опухолевую реактивность.

[00198] Анализ на жизнеспособность клеток может быть проведен, но необязательно, после второго размножения (включая размножение, обозначаемое REF) с помощью стандартных анализов, известных специалистам. Так, например, анализ на исключение трипанового синего может быть осуществлен на образце общих TIL, которые используют для селективного мечения погибших клеток, и этот анализ позволяет проводить оценку жизнеспособности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, образцы TIL могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность на автоматическом счетчике клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, жизнеспособность определяют в соответствии с протоколом подсчета клеток на автоматическом визуализирующем цитометре Cellometer K2, как описано в Примере 2.

[00199] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки культивируют для общего второго размножения в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней, а затем распределяют в более, чем один контейнер или колбу.

[00200] В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для второго размножения (например, иногда обозначаемая CM2 или называемая второй клеточной культуральной средой) содержит IL-2, ОКТ-3, а также антигенпрезентирующие

клетки-фидеры (APC), более подробно обсуждаемые ниже.

[00201] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующие клетки-фидеры представляют собой РВМС. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующие клетки-фидеры представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки-фидеры. В одном из вариантов осуществления изобретения, отношение TIL к антигенпрезентирующим клеткам-фидерам во втором размножении составляет приблизительно 1:25, приблизительно 1:50, приблизительно 1:100, приблизительно 1:125, приблизительно 1:150, приблизительно 1:175, приблизительно 1:200, приблизительно 1:225, приблизительно 1:250, приблизительно 1:275, приблизительно 1:300, приблизительно 1:325, приблизительно 1:350, приблизительно 1:375, приблизительно 1:400 или приблизительно 1:500. В одном из вариантов осуществления изобретения, отношение TIL к антигенпрезентирующим клеткам-фидерам во втором размножении составляет от 1:50 до 1:300. В одном из вариантов осуществления изобретения, отношение TIL к антигенпрезентирующим клеткам-фидерам во втором размножении составляет от 1:100 до 1:200.

[00202] В одном из вариантов осуществления изобретения, для проведения описанных здесь процедур размножения TIL требуется избыток клеток-фидеров во время второго размножения (включая, например, размножение, обозначаемое REP-TIL). Во многих вариантах осуществления изобретения, клетками-фидерами являются моноклеарные клетки периферической крови (РВМС), взятые у здоровых доноров в стандартном отделении для взятия цельной крови. РВМС получают стандартными методами, такими как разделение в градиенте Фиколла-Пака. В одном из вариантов осуществления изобретения, вместо РВМС используют искусственные антигенпрезентирующие клетки (aAPC).

[00203] Обычно, аллогенные РВМС инактивируют либо путем облучения, либо путем тепловой обработки и используют в процедурах REP.

[00204] В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда во время первого размножения содержит IL-2 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IL представляет собой рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью $20-30 \times 10^6$

МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 20×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 25×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 обладает удельной активностью 30×10^6 МЕ/мг на 1 мг-сосуд. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $4-8 \times 10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию $5-7 \times 10^6$ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маточный раствор IL-2 получают как описано в Примере 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 10000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 9000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 7000 МЕ/мл IL-2, приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2 или приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 9000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 8000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 7000 МЕ/мл IL-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 6000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда также содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл,

приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или 8000 МЕ/мл IL-2.

[00205] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная культуральная среда для второго размножения также включает анти-CD3 антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит антитело ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 30 нг/мл антитела ОКТ3. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела ОКТ3. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная культуральная среда содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ3.

[00206] В некоторых вариантах осуществления изобретения, ан анти-CD3 антитело в комбинации с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Этот эффект может быть замечен при использовании полноразмерных антител, а также Fab- и F(ab')₂-фрагментов, причем, предпочтительными являются полноразмерные антитела; см, например, публикацию Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* 1985, 135, 1719, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Специалистам известен ряд подходящих антител против человеческого CD3, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включая

поликлональные и моноклональные антитела против человеческого CD3, происходящие от различных млекопитающих, включая, но не ограничиваясь ими, мышьиные антитела, человеческие антитела, антитела приматов, крысиные и собачьи антитела. В конкретных вариантах осуществления изобретения используется анти-CD3 антитело ОКТ3 (поставляемое от Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

[00207] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки во втором размножении культивируют в культуральной среде с высокими дозами цитокина, а в частности, IL-2, как известно специалистам.

[00208] Альтернативно, также возможно использование комбинаций цитокинов для второго размножения TIL, причем, комбинации из двух или более IL-2, IL-15 и IL-21 являются такими, как они были, в основном, описаны в публикации Международной заявки No. WO 2015/189356 и Международной заявки No. WO 2015/189357, содержание которых точно и во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Таким образом, возможными комбинациями являются IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21 и IL-2, IL-15 и IL-21, причем, во многих вариантах осуществления изобретения, используют именно последнюю комбинацию. Применение комбинаций цитокинов, в частности, благоприятствует продуцированию лимфоцитов и конкретно описанных здесь Т-клеток.

Е. Необязательное повторение Стадии D: второе размножение

[00209] В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение осуществляют один или более раз, то есть, второе размножение повторяют. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение в стадии D, как показано на фигуре 11, повторяют один или более раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение называется дополнительным вторым размножением. В некоторых вариантах осуществления изобретения, где второе размножение осуществляют более, чем один раз (то есть, где второе размножение повторяют), такое размножение может включать процедуры, называемые протоколом быстрого размножения TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяцию клеток TIL размножают после сбора и первого размножения. Этот процесс обычно называется процедурой быстрого размножения (REP), а повторное второе размножение может включать размножение,

обозначаемое reREP. Этот общий протокол обычно осуществляют с использованием культуральной среды, содержащей различные компоненты, включая клетки-фидеры, источник цитокинов и анти-CD3 антитело в газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одно или более последующих вторых размножений осуществляют как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одно или более последующих вторых размножений осуществляют в стадии D, как показано на фигуре 11, и перед стадией E, как показано на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одно, два, три, четыре или более вторых размножений осуществляют как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, одно, два, три, четыре или более вторых размножений осуществляют в стадии D, как показано на фигуре 11 и перед стадией E, как показано на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, два вторых размножения осуществляют как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, два вторых размножения осуществляют в стадии D, как показано на фигуре 11, и перед стадией E, как показано на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, три вторых размножения осуществляют как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, три вторых размножения осуществляют в стадии D, как показано на фигуре 11, и перед стадией E, как показано на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, четыре вторых размножения осуществляют как описано выше. В некоторых вариантах осуществления изобретения, четыре вторых размножения осуществляют в стадии D, как показано на фигуре 11, и перед стадией E, как показано на фигуре 11.

[00210] В некоторых вариантах осуществления изобретения, повторение второго размножения TIL (такого как, например, размножение в Стадии D на фигуре 11) может называться рестимуляцией TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение включает стадию рестимуляции, то есть, повторение второго размножения (например, повторение второго размножения в Стадии D на фигуре 11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, повторное второе размножение (которое может включать размножение, называемое Стадией рестимуляции («reREP»)) осуществляют на клетках, которые были подвергнуты криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации после

Стадии D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, после исходного второго размножения в Стадии D, клетки могут быть культивированы в обычной среде, например, в «остаточной» среде, а затем проводят одну или более стадий второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточная среда содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточная среда не содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточной средой является стандартная клеточная культуральная среда, известная специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточными средами являются AIM-V, DMEM, DMEM/F12, MEM, RPMI, OptiMEM, IMDM или любая другая стандартная среда, известная специалистам, включая коммерчески доступные среды. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточной средой является AIM-V.

[00211] В общих чертах, как обсуждается в настоящей заявке, TIL сначала получают путем приготовления первичной популяции TIL, взятых из опухоли, вырезанной у пациента, как обсуждается в настоящей заявке («первичная клеточная популяция» или «первая клеточная популяция»). Затем проводят первое размножение общих клеток путем культивирования клеток с IL-2, в результате чего получают вторую популяцию клеток (иногда называемую здесь «популяцией общих TIL» или «второй популяцией»). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта процедура также называется исходным или первым размножением.

[00212] Популяцию общих TIL (например, популяцию, полученную в Стадии A на фигуре 11) затем подвергают Стадии REP, иногда называемой первым размножением (например, первым размножением, описанным в Стадии B на фигуре 11), в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки-фидеры (APC), где APC обычно содержат моноклеарные клетки периферической крови (PBMC; или, альтернативно, как обсуждается в настоящей заявке, с использованием антигенпрезентирующих клеток), где быстрое размножение (например, второе размножение, проводимое в Стадии D на фигуре 11) осуществляют по меньшей мере за 14 дней. Как обсуждается в настоящей заявке, среда может также содержать комбинации IL-2, IL-15 и/или IL-23, а не один IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, размножение после второго размножения (например, после Стадии D на фигуре 11) дает

популяцию T1L, которая по меньшей мере в 50 или 100 раз превышает число T1L во второй популяции (например, популяции T1L, полученных в Стадии В на фигуре 11). В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция T1L, полученных после второго размножения в Стадии D на фигуре 11, в 50 или 100 раз превышает число T1L, полученных при первом размножении в Стадии В на фигуре 11. T1L оценивают методами подсчета клеток, известными специалистам, включая методы, описанные в Примерах, включая Примеры 1, 2 и 3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для подсчета клеток T1L используют счетчик клеток K2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для подсчета T1L используют визуализирующий цитометр Cellometer IC2.

[00213] В некоторых вариантах осуществления изобретения, как обсуждается в настоящей заявке, популяцию T1L, полученную после второго размножения (иногда называемую третьей популяцией T1L или клеточной популяцией REP) удаляют из дополнительной клеточной культуральной среды (например, культуральной среды, используемой в Стадии D, описанной на фигуре 11, или среды, обозначаемой CM2 в Примерах) и подвергают, но необязательно, криоконсервации в среде для хранения (например, в среде, содержащей 5% ДМСО) до проведения дополнительной стадии второго размножения.

[00214] T1L могут быть подвергнуты, но необязательно, криоконсервации после второго размножения и перед дополнительным вторым размножением. В некоторых вариантах осуществления изобретения, T1L подвергают криоконсервации после проведения Стадии D, описанной на фигуре 11, и перед проведением дополнительной Стадии D, описанной на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, криоконсервированные T1L оттаивают до проведения дополнительного второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, криоконсервированные T1L оттаивают до проведения дополнительной Стадии D, как показано на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, T1L подвергают криоконсервации в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления изобретения, T1L подвергают криоконсервации в клеточной культуральной среде + 5% ДМСО. Альтернативно, клетки удаляют из дополнительной клеточной культуральной среды (например, культуральной среды, используемой в Стадии D, описанной на фигуре 11) и культивируют в остаточной среде. Такими средами являются среды, описанные в примерах 1 и

5, а также в других Примерах. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточной средой может быть среда с IL-2. В некоторых вариантах осуществления изобретения, остаточной средой может быть среда, обозначаемая SM1 в Примерах.

[00215] Дополнительное второе размножение (включая размножение, обозначаемое reREP) осуществляют на оттаянных или покоящихся клетках с использованием дополнительной клеточной культуральной среды (например, среды, описанной в Стадии D на фигуре 11), содержащей IL-2, ОКТ-3 и клетки-фидеры (например, антигенпрезентирующие клетки), обычно содержащие моноклеарные клетки периферической крови (PBMC; или, альтернативно, как обсуждается в настоящей заявке, с использованием антигенпрезентирующих клеток), где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере за 14 дней. Как обсуждается в настоящей заявке, среда может также содержать комбинации IL-2, IL-15 и/или IL-23, а не один IL-2.

[00216] В результате была получена размноженная популяция TIL, которая отличается тем, что эти размноженные TIL имеют большую субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL (например, с исходными общими TIL). В некоторых вариантах осуществления изобретения, эти размноженные TIL представляют собой TIL, полученные в Стадии D, описанной на фигуре 11.

[00217] В некоторых вариантах осуществления изобретения, Т-клетками памяти являются клетки, которые конститутивно экспрессируют CCR7 и CD62L. См., публикацию Sallusto, *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22:745-763, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

[00218] Таким образом, настоящее изобретение относится к способам рестимуляции криоконсервированных TIL после оттаивания с применением методов, проводимых после оттаивания, которые позволяют улучшить метаболическую функцию, такую как гликолиз и дыхание. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ включает получение популяции оттаянных криоконсервированных TIL, которые затем обрабатывают для повышения метаболической функции, что позволяет проводить оптимальный курс лечения после инфузии пациентам.

Г. Стадия Е: Сбор TIL, полученных в Стадии D

[00219] После проведения стадии второго размножения, клетки могут быть собраны. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, TIL собирают после проведения одной, двух, трех, четырех или более стадий второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL собирают после проведения одной, двух, трех, четырех или более стадий второго размножения в соответствии со Стадией D, описанной на фигуре 11.

[00220] TIL могут быть собраны любым подходящим и стерильным методом, включая, например, центрифугирование. Методы сбора TIL хорошо известны специалистам, и любые такие известные методы могут быть осуществлены в способе согласно изобретению.

G. Стадия F: Конечная композиция и/или перенос в пакет для инфузии

[00221] После завершения Стадий A-E, как проиллюстрировано в указанном порядке на фигуре 11, и как подробно описано выше, клетки переносят в контейнер для их использования в целях введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления изобретения, после получения терапевтически достаточного числа TIL вышеописанными способами размножения, эти TIL переносят в контейнер для их использования в целях введения пациенту.

[00222] В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL, размноженные с использованием APC согласно изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления изобретения, фармацевтической композицией является суспензия TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с использованием RBMS согласно изобретению, могут быть введены любым подходящим способом, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, T-клетки вводят путем одной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которую, предпочтительно, проводят в течение приблизительно 30-60 минут. Другими подходящими способами введения являются внутрибрюшинное введение, интратекальное введение и введение в лимфатическую систему.

1. Фармацевтические композиции, дозы и схемы введения доз

[00223] В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL, размноженные с использованием APC согласно изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления изобретения, фармацевтической композицией является суспензия TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с использованием RBMS согласно изобретению, могут быть введены любым подходящим способом, известным специалистам. В некоторых вариантах осуществления изобретения, T-клетки вводят

путем одной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которую, предпочтительно, проводят в течение приблизительно 30–60 минут. Другими подходящими способами введения являются внутрибрюшинное введение, интретекальное введение и введение в лимфатическую систему.

[00224] Может быть введена любая подходящая доза TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для получения подходящей дозы необходимо терапевтически достаточное число TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL вводят в дозе приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$, а в среднем приблизительно $7,8 \times 10^{10}$ TIL, в частности, если раком является меланома. В одном из вариантов осуществления изобретения, вводят приблизительно от $1,2 \times 10^{10}$ до приблизительно $4,3 \times 10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вводят приблизительно от 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вводят приблизительно от 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вводят приблизительно от 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вводят приблизительно от 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вводят приблизительно от 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза приблизительно $7,8 \times 10^{10}$ TIL, в частности, если раком является меланома. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от $1,2 \times 10^{10}$ до приблизительно $4,3 \times 10^{10}$ TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения,

терапевтически эффективная доза составляет приблизительно от 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[00225] В некоторых вариантах осуществления изобретения, число TIL, имеющихся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В одном из вариантов осуществления изобретения, число TIL, имеющихся в фармацевтических композициях согласно изобретению, составляет в пределах 1×10^6 – 5×10^6 , 5×10^6 – 1×10^7 , 1×10^7 – 5×10^7 , 5×10^7 – 1×10^8 , 1×10^8 – 5×10^8 , 5×10^8 – 1×10^9 , 1×10^9 – 5×10^9 , 5×10^9 – 1×10^{10} , 1×10^{10} – 5×10^{10} , 5×10^{10} – 1×10^{11} , 5×10^{11} – 1×10^{12} , 1×10^{12} – 5×10^{12} и 5×10^{12} – 1×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления изобретения, терапевтически эффективная доза составляет приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} .

[00226] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет менее, чем, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс/масс, масс/об или об/об фармацевтической композиции.

[00227] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет более, чем 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%,

30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25%, 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25%, 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25%, 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25%, 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25%, 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25%, 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25%, 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25%, 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25%, 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25%, 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25%, 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25%, 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25%, 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25%, 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25%, 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс/масс, масс/об, или об/об фармацевтической композиции.

[00228] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет в пределах приблизительно от 0,0001% до приблизительно 50%, приблизительно от 0,001% до приблизительно 40%, приблизительно от 0,01% до приблизительно 30%, приблизительно от 0,02% до приблизительно 29%, приблизительно от 0,03% до приблизительно 28%, приблизительно от 0,04% до приблизительно 27%, приблизительно от 0,05% до приблизительно 26%, приблизительно от 0,06% до приблизительно 25%, приблизительно от 0,07% до приблизительно 24%, приблизительно от 0,08% до приблизительно 23%, приблизительно от 0,09% до приблизительно 22%, приблизительно от 0,1% до приблизительно 21%, приблизительно от 0,2% до приблизительно 20%, приблизительно от 0,3% до приблизительно 19%, приблизительно от 0,4% до приблизительно 18%, приблизительно от 0,5% до приблизительно 17%, приблизительно от 0,6% до приблизительно 16%, приблизительно от 0,7% до приблизительно 15%, приблизительно от 0,8% до приблизительно 14%, приблизительно от 0,9% до приблизительно 12% или приблизительно от 1% до приблизительно 10% масс/масс, масс/об или об/об фармацевтической композиции.

[00229] В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет в пределах приблизительно от 0,001% до приблизительно 10%, приблизительно от 0,01% до приблизительно 5%, приблизительно от 0,02% до приблизительно 4,5%,

приблизительно от 0,03% до приблизительно 4%, приблизительно от 0,04% до приблизительно 3,5%, приблизительно от 0,05% до приблизительно 3%, приблизительно от 0,06% до приблизительно 2,5%, приблизительно от 0,07% до приблизительно 2%, приблизительно от 0,08% до приблизительно 1,5%, приблизительно от 0,09% до приблизительно 1%, приблизительно от 0,1% до приблизительно 0,9% масс/масс, масс/об или об/об фармацевтической композиции.

[00230] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению меньше или равно 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

[00231] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL в фармацевтических композициях согласно изобретению составляет более, чем 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[00232] TIL, присутствующие в фармацевтических композициях согласно изобретению, являются эффективными при их введении в широких интервалах доз. Точная доза зависит от способа введения, формы вводимого соединения, пола и возраста индивидуума, подвергаемого лечению, массы тела индивидуума, подвергаемого лечению, а также от предпочтения и опыта лечащего врача. При необходимости, могут быть также использованы клинически

вычисленные дозы TIL. Количества фармацевтических композиций, вводимых описанными здесь способами, такие как дозы TIL, зависят от особенностей человека или млекопитающего, подвергаемого лечению, тяжести расстройства или состояния, частоты введения, степени усваиваемости активных фармацевтических ингредиентов и от назначения лечащего врача.

[00233] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть введены в разовой дозе. Таким введением может быть инъекция, например, внутривенная инъекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть введены в виде дробных доз. Дозы могут быть введены один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более, чем шесть раз в год. Доза может быть введена один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или через день. Введение TIL при необходимости может быть продолжено.

[00234] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективная доза TIL приблизительно составляет 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективная доза TIL составляет в пределах 1×10^6 – 5×10^6 , 5×10^6 – 1×10^7 , 1×10^7 – 5×10^7 , 5×10^7 – 1×10^8 , 1×10^8 – 5×10^8 , 5×10^8 – 1×10^9 , 1×10^9 – 5×10^9 , 5×10^9 – 1×10^{10} , 1×10^{10} – 5×10^{10} , 5×10^{10} – 1×10^{11} , 5×10^{11} – 1×10^{12} , 1×10^{12} – 5×10^{12} и 5×10^{12} – 1×10^{13} .

[00235] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективная доза TIL составляет в пределах приблизительно от 0,01 мг/кг до приблизительно 4,3 мг/кг, приблизительно от 0,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг до приблизительно 3,2 мг/кг, приблизительно от 0,35 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, приблизительно от 0,15 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг до приблизительно 2,15 мг/кг, приблизительно от 0,45 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, приблизительно от 0,15 мг/кг до приблизительно 1,3 мг/кг, приблизительно от 0,3 мг/кг до приблизительно 1,15 мг/кг, приблизительно от 0,45 мг/кг до

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

[00236] В некоторых вариантах осуществления изобретения,
 эффективная доза TIL составляет приблизительно от 1 мг до
 приблизительно 500 мг, приблизительно от 10 мг до приблизительно
 300 мг, приблизительно от 20 мг до приблизительно 250 мг,
 приблизительно от 25 мг до приблизительно 200 мг, приблизительно
 от 1 мг до приблизительно 50 мг, приблизительно от 5 мг до
 приблизительно 45 мг, приблизительно от 10 мг до приблизительно
 40 мг, приблизительно от 15 мг до приблизительно 35 мг,
 приблизительно от 20 мг до приблизительно 30 мг, приблизительно
 от 23 мг до приблизительно 28 мг, приблизительно от 50 мг до
 приблизительно 150 мг, приблизительно от 60 мг до приблизительно
 140 мг, приблизительно от 70 мг до приблизительно 130 мг,
 приблизительно от 80 мг до приблизительно 120 мг, приблизительно
 от 90 мг до приблизительно 110 мг, или приблизительно от 95 мг
 до приблизительно 105 мг, приблизительно от 98 мг до
 приблизительно 102 мг, приблизительно от 150 мг до
 приблизительно 250 мг, приблизительно от 160 мг до
 приблизительно 240 мг, приблизительно от 170 мг до
 приблизительно 230 мг, приблизительно от 180 мг до
 приблизительно 220 мг, приблизительно от 190 мг до
 приблизительно 210 мг, приблизительно от 195 мг до
 приблизительно 205 мг, или приблизительно от 198 до
 приблизительно 207 мг.

[00237] Эффективное количество TIL может быть введено либо в разовой, либо в дробных дозах любыми общепринятыми способами введения агентов, имеющих аналогичное применение, включая интраназальные и трансдермальные введения, внутриартериальную инъекцию, внутривенную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, парентеральную инъекцию, внутримышечную инъекцию, подкожную инъекцию, местное введение, введение путем трансплантации или ингаляции.

Н. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток

[00238] Необязательный анализ на жизнеспособность клеток может быть осуществлен после первого размножения в стадии В с помощью стандартных анализов, известных специалистам. Так, например, анализ на исключение трипанового синего может быть проведен на образце общих TIL для селективного мечения погибших клеток и оценки жизнеспособности. Другими анализами, используемыми для оценки жизнеспособности, могут быть, но не ограничиваются ими, анализ с использованием аламарового синего и анализ с использованием МТТ.

1. Число клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00239] В некоторых вариантах осуществления изобретения определяют число клеток и/или их жизнеспособность. Экспрессия маркеров, таких как, но не ограничивающихся ими, CD3, CD4, CD8, и CD56, а также любых других раскрытых или описанных здесь маркеров, может быть определена с помощью проточной цитометрии с использованием антител, например, таких как, но не ограничивающихся ими, коммерчески доступные антитела, поставляемые BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA) с использованием проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки могут быть подсчитаны вручную с использованием однократного гемоцитометра на с-чипе (VWR, Batavia, IL), а жизнеспособность может быть оценена любым известным методом, включая, но не ограничиваясь ими, окрашивание трипановым синим.

[00240] В некоторых случаях, популяция общих TIL может быть сразу подвергнута криоконсервации в соответствии с протоколами, обсуждаемыми ниже. Альтернативно, популяция общих TIL может быть подвергнута REP, а затем криоконсервации, как обсуждается ниже. Аналогичным образом, в случае использования в терапии генетически модифицированных TIL, популяции общих TIL или REP-TIL может быть подвергнута генетическим модификациям для подходящего лечения.

2. Клеточные культуры

[00241] В одном из вариантов осуществления изобретения, способ размножения TIL может включать использование приблизительно от 5000 мл до приблизительно 25000 мл клеточной среды, приблизительно от 5000 мл до приблизительно 10000 мл клеточной среды, или приблизительно от 5800 мл до приблизительно 8700 мл клеточной среды. В одном из вариантов осуществления изобретения, для размножения ряда TIL используют клеточную культуральную среду не более, чем одного типа. При этом, может быть использована любая подходящая клеточная культуральная среда, например, клеточная культуральная среда AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ сульфата стрептомицина и 10 мкМ сульфата гентамицина) (Invitrogen, Carlsbad CA). В соответствии с этим, способы согласно изобретению применяются преимущественно для снижения количества среды и ряда сред различных типов, необходимых для размножения различных TIL. В одном из вариантов осуществления изобретения, размножение ряда TIL может включать добавление свежей клеточной культуральной среды в клетки (также называемое подпиткой клеток) не чаще, чем через каждые три или четыре дня. Размножение ряда клеток в газопроницаемом контейнере облегчает проведение процедур, необходимых для размножения ряда клеток благодаря снижению частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

[00242] В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная среда в первом и/или во втором газопроницаемом контейнере является нефильтованной. Использование нефильтованной клеточной среды может облегчать проведение процедур, необходимых для размножения ряда клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения, клеточная среда в первом и/или во втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME).

[00243] В одном из вариантов осуществления изобретения, продолжительность проведения способа, включающего получение образца ткани опухоли у млекопитающего; культивирование образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, содержащем описанную здесь клеточную среду; получение TIL из образца ткани опухоли; и размножение ряда TIL во втором газопроницаемом контейнере, содержащем описанную здесь клеточную среду с использованием aAPC, составляет приблизительно от 14 до приблизительно 42 дней, например, приблизительно 28 дней.

[00244] В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры применяют для размножения TIL с использованием РВМС с помощью способов, композиций и устройств, известных специалистам, включая способы, композиции и устройства, описанные в публикации заявки на патент США No. 2005/0106717 A1, содержание которой вводится в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL размножают в газопроницаемых пакетах. В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL размножают с использованием системы размножения клеток, которая позволяет размножать TIL в газопроницаемых пакетах, таких как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL размножают с использованием системы размножения клеток, которая позволяет размножать TIL в газопроницаемых пакетах, таких как система биореакторов WAVE Bioreactor System, также известная как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления изобретения, система размножения клеток включает газопроницаемый пакет для клеток в объеме, выбранном из группы, состоящей из приблизительно 100 мл, приблизительно 200 мл, приблизительно 300 мл, приблизительно 400 мл, приблизительно 500 мл, приблизительно 600 мл, приблизительно 700 мл, приблизительно 800 мл, приблизительно 900 мл, приблизительно 1 л, приблизительно 2 л, приблизительно 3 л, приблизительно 4 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л и приблизительно 10 л. В одном из вариантов осуществления изобретения, TIL могут быть размножены в колбах n G-Rex (поставляемых от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты позволяют размножать клеточные популяции приблизительно от 5×10^5 клеток/см² до 10×10^6 – 30×10^6 клеток/см². В одном из вариантов осуществления изобретения, такое размножение осуществляют без добавления свежей клеточной культуральной среды в клетки (также называемого подпиткой клеток). В одном из вариантов осуществления изобретения, такое размножение осуществляют без подпитки при условии, что высота среды в колбе GRex будет составлять приблизительно 10 см. В одном из вариантов осуществления изобретения, такое размножение осуществляют без подпитки, но с добавлением одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления изобретения, цитокин может быть

добавлен в виде болюса без какого-либо смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны специалистам и применяются для размножения TIL, как описано в публикации заявки на патент США No. US 2014/0377739A1, в публикации Международной заявки No. WO 2014/210036 A1, в публикации заявки на патент США No. US 2013/0115617 A1, в публикации Международной заявки No. WO 2013/188427 A1, в публикации заявки на патент США No. US 2011/0136228 A1, в патенте США No. 8809050 B2, в публикации Международной заявки No. WO 2011/072088 A2, в публикации заявки на патент США No. US 2016/0208216 A1, в публикации заявки на патент США No. US 2012/0244133 A1, в публикации Международной заявки No. WO 2012/129201 A1, в публикации заявки на патент США No. US 2013/0102075 A1, в патенте США No. 8956860 B2, в публикации Международной заявки No. WO 2013/173835 A1, в публикации заявки на патент США No. US 2015/0175966 A1, содержание которых вводится в настоящее описание посредством ссылки. Такие способы также описаны Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, 2012, 35:283-292. Optional Genetic Engineering of TILs.

[00245] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL генетически конструируют, но необязательно, для включения дополнительных функциональных молекул, включая, но не ограничиваясь ими, высокоаффинный T-клеточный рецептор (TCR), например, TCR, нацеленный на опухолеассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с опухолеассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, с мекотелином) или с молекулой клеточной поверхности, рестриктированной по линии дифференцировки (например, CD19).

I. Необязательная криоконсервация TIL

[00246] Как обсуждалось выше в Стадиях А-Е, криоконсервация может быть осуществлена в различные периоды времени проведения способа размножения TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, популяция общих TIL после первого размножения в соответствии со Стадией В или размноженная популяция TIL после одного или более вторых размножений в соответствии со Стадией D могут быть подвергнуты криоконсервации. Криоконсервация может быть осуществлена, в основном, путем помещения популяции TIL в замораживающий раствор, например, в 85% инактивированную компонентом сыворотку АВ и 15% диметилсульфоксид (ДМСО). Клетки

в растворе помещают в криогенные сосуды и хранят в течение 24 часов при -80°C , с необязательным переносом в холодильники с газообразным азотом для криоконсервации. См., Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации в клеточной культуральной среде плюс 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации способами, описанными в Примерах 8 и 9.

[00247] При необходимости, клетки вынимают из холодильника и оттаивают на водяной бане при 37°C до оттаивания приблизительно 4/5 раствора. Обычно, клетки ресуспендируют в полной среде и промывают, но необязательно, один или более раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, оттаянные TIL могут быть подсчитаны и оценены на жизнеспособность как известно специалистам.

J. Фенотипические свойства размноженных TIL

[00248] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на экспрессию множества фенотипических маркеров после размножения, включая маркеры, описанные здесь и в Примерах. В одном из вариантов осуществления изобретения оценивают экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фенотипические свойства TIL анализируют после первого размножения в Стадии В. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фенотипические свойства TIL анализируют во время перехода к Стадии С. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фенотипические свойства TIL анализируют во время перехода к Стадии С и после криоконсервации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фенотипические свойства TIL анализируют после второго размножения в соответствии со Стадией D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фенотипические свойства TIL анализируют после двух или более размножений в соответствии со Стадией D. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер выбран из группы, состоящей из TCRab, CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер выбран из группы, состоящей из TCRab, CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 и CD8a. В одном из вариантов осуществления изобретения, маркер выбран из

группы, состоящей из CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцати маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают экспрессию одного или более маркеров каждой группы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессию одного или более маркеров HLA-DR, CD38 и CD69 поддерживают (то есть, их экспрессия не обнаруживает статистически значимых различий) в свежих TIL, но не в оттаянных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, статус активации TIL поддерживают в оттаянных TIL.

[00249] В одном из вариантов осуществления изобретения оценивают уровень экспрессии одного или более регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1 и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия регуляторной молекулы в оттаянных TIL ниже, чем в свежих TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессия регуляторных молекул LAG-3 и TIM-3 в оттаянных TIL ниже, чем в свежих TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, какого-либо значимого различия в уровнях экспрессии CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ не наблюдалось. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в свежих TIL и в оттаянных TIL какого-либо значимого различия в уровнях экспрессии CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ и/или маркеров памяти не наблюдалось.

[00250] В некоторых вариантах осуществления изобретения, маркер памяти выбран из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

[00251] В некоторых вариантах осуществления изобретения, жизнеспособность свежих TIL по сравнению с оттаянными TIL составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 98%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, жизнеспособность свежих и оттаянных

TIL составляет более, чем 70%, более, чем 75%, более, чем 80%, более, чем 85%, более, чем 90%, более, чем 95%, или более, чем 98%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, жизнеспособность свежего и оттаянного продукта составляет более, чем 80%, более, чем 81%, более, чем 82%, более, чем 83%, более, чем 84%, более, чем 85%, более, чем 86%, более, чем 87%, более, чем 88%, более, чем 89%, или более, чем 90%. В некоторых вариантах осуществления изобретения, жизнеспособность свежего и оттаянного продукта составляет более, чем 86%.

[00252] В одном из вариантов осуществления изобретения, рестимулированные TIL могут быть также оценены на высвобождение цитокинов с помощью анализов на высвобождение цитокинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть также оценены на секрецию интерферона-7 (IFN-7) в ответ на ОКТ3-стимуляцию или совместное культивирование с аутологичным опухолевым гидролизатом. Так, например, в тех вариантах осуществления изобретения, в которых используется ОКТ3-стимуляция, TIL интенсивно промывают, и лунки-дубликаты приготавливают с использованием 1×10^5 клеток в 0,2 мл CM в 96-луночных плоскодонных планшетах, предварительно покрытых 0,1 или 1,0 мкг/мл ОКТ3, разведенного в забуференном фосфатом физиологическом растворе. После инкубирования в течение ночи, супернатанты собирают, и IFN-7 в супернатанте оценивают с помощью ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Для анализа методом совместного культивирования, 1×10^5 клеток TIL помещают в 96-луночный планшет с аутологичными опухолевыми клетками (в отношении 1:1). После инкубирования в течение 24 часов, супернатанты собирают, и высвобождение IFN-7 может быть оценено, например, с помощью ELISA.

[00253] Анализ биомаркеров клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии: образцы TIL разделяют на аликвоты для анализа маркеров клеточной поверхности с помощью проточной цитометрии, см., например, Примеры 7, 8 и 9.

[00254] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL оценивают на различные регуляторные маркеры. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторный маркер выбран из группы, состоящей из TCR α/β , CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R, CCR7, CD62L, KLRG1 и CD122. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является TCR α/β . В некоторых вариантах осуществления

изобретения, регуляторным маркером является CD56. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD27. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD28. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD57. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD45RA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD45R0. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD25. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD127. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD95. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является IL-2R. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CCR7. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD62L. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является KLRG1. В некоторых вариантах осуществления изобретения, регуляторным маркером является CD122.

К. Метаболическое дыхание размноженных TIL

[00255] Рестимулированные TIL охарактеризовывают по значительному усилению базального гликолиза по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL после оттаивания.

[00256] Недостаточная дыхательная способность (SRC) и гликолитический резерв могут быть оценены для TIL, размноженных в присутствии aAPC aEM3 по сравнению с PBMC-фидерами. Тест на митологический стресс клеток Seahorse XF позволяет оценивать митохондриальную функцию благодаря прямой оценке скорости поглощения кислорода (OCR) клетками с использованием модуляторов дыхания, которые нацелены на компоненты цепи переноса электронов в митохондриях. Тестируемые соединения (олигомицин, FCCP и смесь ротенона и антимицина А, описанные ниже) последовательно вводят для оценки уровня продуцирования АТФ, максимального дыхания и не-митохондриального дыхания, соответственно. Затем, оценивают уровень утечки протонов и недостаточную дыхательную способность с использованием этих параметров и параметров базального дыхания. Каждый модулятор нацелен на специфический компонент цепи транспорта электронов. Олигомицин ингибирует АТФ-синтазу (комплекс V), и снижение OCR после инъекции олигомицина коррелирует с митохондриальным дыханием, ассоциированным с

продуцированием АТФ клетками. Карбонилцианид-4-(трифторметокси)фенилгидразон (FCCP) представляет собой несвязывающий агент, который ингибирует протонный градиент и нарушает мембранный потенциал митохондрий. В результате, поток электронов через цепь транспорта электронов не ингибируется, и кислород максимально поглощается комплексом IV. Затем FCCP-стимулированную OCR используют для вычисления недостаточной дыхательной способности, определенной как разность между максимальным дыханием и базальным дыханием. Недостаточная дыхательная способность (SRC) является показателем способности клеток отвечать на повышенную потребность в передаче энергии. Третьей инъекцией является смесь ротенона, ингибитора комплекса I и антимицина А, ингибитора комплекса III. Эта комбинация блокирует митохондриальное дыхание и позволяет вычислить немитохондриальное дыхание, индуцированное процессами, происходящими за пределами митохондрий.

[00257] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метаболическим анализом является анализ на базальное дыхание. В основном, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют уровень базального дыхания, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень базального дыхания составляет приблизительно от 50% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень базального дыхания составляет приблизительно от 60% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень базального дыхания составляет приблизительно от 70% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень базального дыхания составляет приблизительно от 80% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень

базального дыхания составляет приблизительно от 90% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, уровень базального дыхания составляет приблизительно от 95% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют уровень базального дыхания, который не имеет статистически значимых отличий от уровня базального дыхания свежесобранных TIL.

[00258] В основном, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL, которые были подвергнуты второму дополнительному размножению) имеют недостаточную дыхательную способность, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 50% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 60% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 70% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 80% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 90% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, недостаточная дыхательная способность составляет приблизительно от 95% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют недостаточную дыхательную способность, которая не имеет статистически значимых отличий от уровня базального дыхания свежесобранных TIL.

[00259] В основном, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как TIL, например, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют недостаточную дыхательную способность, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в метаболическом анализе оценивают гликолитический резерв. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метаболическим анализом является анализ гликолитического резерва. В некоторых вариантах осуществления изобретения, метаболическим анализом является анализ недостаточной дыхательной способности. Для оценки клеточного (дыхательного) метаболизма, клетки обрабатывают ингибиторами митохондриального дыхания и гликолиза для определения метаболического профиля TIL, состоящего из следующих параметров: базального окислительного фосфорилирования (оцениваемого по OCR), недостаточной дыхательной способности, базальной гликолитической активности (оцениваемой по ECAR) и гликолитического резерва. Метаболические профили оценивают с помощью комбинированного анализа для тестирования митохондриального/гликолитического стресса Seahorse (включая набор, поставляемый Agilent®), где указанный анализ позволяет определить способность клеток осуществлять гликолиз после блокирования продуцирования АТФ митохондриями. В некоторых вариантах осуществления изобретения, из клеток удаляют глюкозу, а затем глюкозу снова вводят, после чего вводят агент, индуцирующий стресс. В некоторых вариантах осуществления изобретения, агент, индуцирующий стресс, выбран из группы, состоящей из олигомицина, FCCP, ротенона, антимицина А и/или 2-дезоксиглюкозы (2-DG), а также их комбинаций. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, олигомицин добавляют в концентрации 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, FCCP добавляют в концентрации 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, ротенон добавляют в концентрации 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антимицин А добавляют в концентрации 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, 2-дезоксиглюкозу (2-DG) добавляют в концентрации 500 мМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают гликолитическую способность, гликолитический резерв и/или не-гликолитическое подкисление. В основном, TIL имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 50% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 60% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 70% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 80% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 90% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 95% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL.

[00260] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метаболическим анализом является анализ базального гликолиза. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как, TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL,

обозначенные reREP-TIL, которые были подвергнуты второму дополнительному размножению), имеют уровень базального гликолиза, который выше по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в шесть раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в восемь раз, по меньшей мере в девять раз или по меньшей мере в десять раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют уровень базального гликолиза, который выше приблизительно в 2-10 раз. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют уровень базального гликолиза, который выше приблизительно в 2-8 раз. TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют уровень базального гликолиза, который выше приблизительно в 3-7 раз. TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют уровень базального гликолиза, который выше приблизительно в 2-4 раза. TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL), имеют уровень базального гликолиза, который выше приблизительно в 2-3 раза.

[00261] В основном, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения, такие как TIL, описанные в Стадии D (включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL, которые были подвергнуты второму дополнительному размножению), имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от

50% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 60% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 70% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 80% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 90% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гликолитический резерв составляет приблизительно от 95% до приблизительно 99% от уровня базального дыхания свежесобранных TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют недостаточную дыхательную способность, которая не имеет статистически значимых отличий от уровня базального дыхания свежесобранных TIL.

[00262] Продуцирование гранзима В: гранзим В является другим показателем способности TIL уничтожать клетки-мишени. Супернатанты среды, рестимулированные как описано выше с использованием антител против CD3, CD28 и CD137/4-1BB, были также оценены на уровне гранзима В с использованием набора для ELISA-анализа на человеческий гранзим В DuoSet (R & D Systems, Minneapolis, MN) в соответствии с инструкциями производителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая, например, TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют повышенный уровень продуцирования гранзима В. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL после второго размножения или TIL после второго дополнительного размножения (такие как, например, TIL, описанные в Стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначенные reREP-TIL) имеют повышенную цитотоксическую активность.

[00263] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способы согласно изобретению включают анализ на жизнеспособность TIL, проводимый описанными выше способами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL размножают как обсуждается выше, включая, например, размножение, описанное на фигуре 11. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL подвергают криоконсервации, а затем оценивают на жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления изобретения, оценка жизнеспособности включает оттаивание TIL, а затем осуществление первого размножения, второго размножения и дополнительного второго размножения. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам анализа на пролиферацию клеток, клеточную токсичность, клеточную гибель и/или другие параметры, относящиеся к жизнеспособности популяции TIL. Жизнеспособность может быть оценена с помощью любых описанных выше метаболических анализов TIL, а также с применением любых методов оценки жизнеспособности клеток, известных специалистам. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способам анализа на пролиферацию клеток, клеточную токсичность, клеточную гибель и/или другие параметры, относящиеся к жизнеспособности TIL, размноженных описанными здесь способами, включая способы, проиллюстрированные на фигуре 11.

[00264] Настоящее изобретение также относится к способам анализа для определения жизнеспособности TIL. В настоящем изобретении раскрываются способы анализа TIL на жизнеспособность путем размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением более крупной популяции TIL, где указанные способы включают:

(i) получение первой популяции TIL, которые были предварительно размножены;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 или в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции

T1L, где третья популяция T1L включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией T1L, и где третью популяцию также анализируют на жизнеспособность.

[00265] В некоторых вариантах осуществления изобретения, указанный способ также включает:

(iv) осуществление дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции T1L дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной популяции T1L, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная популяция T1L включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со третьей популяцией T1L, и где третью популяцию также анализируют на жизнеспособность.

[00266] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед стадией (i), клетки подвергают криоконсервации.

[00267] В некоторых вариантах осуществления изобретения, перед проведением стадии (i), клетки оттаивают.

[00268] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию (iv) повторяют от одного до четырех раз в целях получения T1L в количестве, достаточном для анализа.

[00269] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней.

[00270] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней.

[00271] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i) - (iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней.

[00272] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i) - (iii) или (iv) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

[00273] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки стадий (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток.

[00274] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются моноклеарные клетки

периферической крови (PBMC).

[00275] В некоторых вариантах осуществления изобретения, PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

[00276] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в более крупной популяции TIL в стадии (iv), в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[00277] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[00278] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

[000279] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00280] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[00281] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей Т-клеточный сигнал.

[00282] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[00283] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность.

[00284] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации.

[00285] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после криоконсервации и после стадии (iv).

[00286] В соответствии с этим, настоящее изобретение относится к способу анализа TIL на жизнеспособность и/или на возможность последующего его использования для введения индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ анализа на опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (TIL) включает:

- (i) получение первой популяции TIL;
- (ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и
- (iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 раз превышает вторую популяцию TIL;
- (iv) сбор, промывку и криоконсервацию третьей популяции TIL;
- (v) хранение криоконсервированных TIL при криогенной температуре;
- (vi) оттаивание третьей популяции TIL с получением оттаянной третьей популяции TIL; и
- (vii) осуществление дополнительного второго размножения части оттаянной третьей популяции TIL путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции IL-2, ОКТ-3 и APC для reREP в течение по меньшей мере 3 дней, где третье размножение проводят для получения четвертой популяции TIL, где число TIL в четвертой популяции TIL сравнивают с числом TIL в третьей популяции TIL с получением отношения;
- (viii) определение, исходя из отношения в стадии (vii), может ли оттаянная популяция TIL быть подходящей для введения пациенту;
- (ix) введение терапевтически эффективной дозы оттаянной третьей популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL превышает 5:1 в стадии (viii).

[00287] В некоторых вариантах осуществления изобретения, осуществление reREP продолжают до тех пор, пока отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL не превышало 50:1.

[00288] В некоторых вариантах осуществления изобретения, количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

[00289] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадии (i)-(vii) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

[00290] В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки стадий (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения, клетками являются TIL.

[00291] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). В некоторых вариантах осуществления изобретения, PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

[00292] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в более крупной популяции TIL в стадиях (iii) или (vii), в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

[00293] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

[00294] В некоторых вариантах осуществления изобретения, APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

[00295] В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным

вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00296] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[00297] В некоторых вариантах осуществления изобретения проводят стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей Т-клеточный сигнал.

[00298] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

[00299] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL анализируют на жизнеспособность после стадии (vii).

[00300] Настоящее изобретение также относится к способам анализа TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, настоящее изобретение относится к способу анализа TIL, включающему:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) оттаивание части первой популяции криоконсервированных TIL;

(iii) осуществление первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC) для проведения reREP по меньшей мере в течение 3 дней с получением второй популяции TIL, где часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL и получают отношение числа TIL, где отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 5:1;

(iv) определение, исходя из отношения в стадии (iii), может ли первая популяция TIL быть подходящей для ее использования в целях терапевтического введения пациенту;

(v) оценку возможности применения первой популяции TIL для терапевтического введения, если отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в первой популяции TIL превышает 5:1 в стадии (iv).

[00301] В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части

первой популяции TIL превышает 50:1.

[00302] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает осуществление размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i) способами, описанными в любом из представленных здесь вариантов осуществления изобретения.

[00303] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i).

[00304] В некоторых вариантах осуществления изобретения, криоконсервированные TIL оттаивают и осуществляют второе размножение для того, чтобы определить, являются ли клетки размноженными в достаточной степени. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 5:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 10:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 15:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 20:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 25:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 30:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 35:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 40:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 45:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту. Если клетки размножены до отношения по меньшей мере 5:1, то TIL являются достаточно жизнеспособными для их введения пациенту.

[00305] Настоящее изобретение также относится к дополнительным способам анализа TIL. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу анализа TIL, включающему:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) оттаивание части первой популяции криоконсервированных

TIL;

(iii) осуществление первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC) для проведения reREP по меньшей мере в течение 3 дней с получением второй популяции TIL, где часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL и получают отношение числа TIL, где отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 5:1;

(iv) определение, исходя из отношения в стадии (iii), может ли первая популяция TIL быть подходящей для ее использования в целях терапевтического введения пациенту; и

(v) терапевтическое введение остальной части первой популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в первой популяции TIL превышает 5:1 в стадии (iv).

[00306] В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 50:1.

[00307] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает осуществление размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i) способами, описанными в любом из предшествующих пунктов.

[00308] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i).

[00309] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию оценки метаболического дыхания второй популяции TIL.

[00310] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ также включает стадию оценки фенотипа второй популяции TIL.

[00311] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенпрезентирующими клетками являются аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

L. Способы лечения пациентов

[00312] Способы лечения начинают со сбора TIL и культивирования TIL. Такие способы описаны в литературе, например, в публикации Jin et al. (*J. Immunotherapy*, 2012,

35(3):283-292), которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Эти способы также описаны ниже в разделе «Примеры».

[00313] Настоящее изобретение относится к новым способам получения TIL, которые не были описаны ранее, например, TIL, полученные в Стадиях А-Е. Размноженные TIL, полученные в Стадиях А-Е, как описано выше, или полученные каким-либо другим способом, описанным в настоящей заявке, находят конкретное применение при лечении пациентов с раком. Общие методы применения TIL для лечения рака описаны в публикации Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, 2016, 34(20):2389-239, а также в приложении к этой публикации, содержание которых во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Аналогичным образом, TIL, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут быть также использованы для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL были культивированы из вырезанных метастазов меланомы, как было описано ранее (см., публикацию Dudley, et al., *J Immunother.*, 2003, 26:332-342, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). Свежая опухоль может быть измельчена в стерильных условиях. Репрезентативный образец может быть взят для проведения стандартного гистологического анализа. Отдельные фрагмент имели размер 2 мм³-3 мм³. В некоторых вариантах осуществления изобретения было получено 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения было получено 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения было получено 20, 22, 24, 26 или 28 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления изобретения было получено 24 образца для каждого пациента. Образцы могут быть помещены в отдельные лунки 24-луночного планшета с последующим их хранением в культуральной среде с высокой дозой IL-2 (6000 МЕ/мл) и мониторингом на деструкцию опухоли и/или пролиферацию TIL. Любая опухоль с жизнеспособными клетками, оставшимися после обработки, может быть ферментативно расщеплена с получением моноклеточной суспензии и подвергнута криоконсервации как описано в настоящей заявке.

[00314] В некоторых вариантах осуществления изобретения, размноженные TIL могут быть собраны для фенотипического анализа (на CD3, CD4, CD8 и CD56) и протестированы на аутологичную

опухоль, если она имеется. TIL могут рассматриваться как реактивные, если ночная совместная культура имела уровни интерферона-гамма (IFN- γ) >200 пг/мл и уровни, в два раза превышающие фоновый уровень. (Публикация Goff et al., *J Immunother.*, 2010, 33:840-847, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления изобретения, культуры с явной аутологичной реактивностью или с достаточными паттернами роста могут быть отобраны для второго размножения (например, второго размножения, описанного в стадии D на фигуре 11), включая вторые размножения, которые иногда называются быстрым размножением (REP). В некоторых вариантах осуществления изобретения, размноженные TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, с высоким уровнем пролиферации во втором размножении) отбирают для второго дополнительного размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, с высоким уровнем пролиферации во втором размножении, описанном в стадии D на фигуре 11) отбирают для второго дополнительного размножения в соответствии со стадией D, описанной на фигуре 11.

[00315] В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту не проводят прямой АСТ (адоптивный клеточный перенос), например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, клетки не используют сразу после сбора опухоли и/или первого размножения. В таких вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 2 дня до стадии второго размножения (например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, за 2 дня до стадии, называемой стадией REP). В таких вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 2 дня до стадии второго размножения (например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, за 2 дня до стадии D, как показано на фигуре 11). Как описано в различных вариантах настоящей заявки, во втором размножении (включая способы, называемые REP) используют антитело ОКТ3 (анти-CD3 антитело) (Miltenyi Biotech, San Diego, CA) и IL-2 (3000 МЕ/мл; Prometheus, San Diego, CA) в присутствии облученных клеток-фидеров, по возможности аутологичных, в отношении 100:1 (см. публикацию Dudley, et al., *J Immunother.*, 2003, 26:332-342, которая во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки). В некоторых

вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 5 дней до стадии второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 4 дня до стадии второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 3 дня до стадии второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 2 дня до стадии второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны за 1 день до стадии второго размножения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть подвергнуты криоконсервации и оттаяны непосредственно перед проведением стадии второго размножения.

[00316] Клеточные фенотипы криоконсервированных образцов TIL в пакетах для инфузии могут быть проанализированы с помощью проточной цитометрии (FlowJo) на поверхностные маркеры CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любыми описанными здесь методами. Уровни цитокинов в сыворотке определяли стандартными методами твердофазного иммуноферментного анализа. Увеличение IFN- γ в сыворотке было определено как >100 пг/мл и более, чем в 4-3 раза превышало фоновые уровни.

1. Необязательное предварительное кондиционирование для истощения лимфосистемы у пациентов

[00317] Данные эксперимента показали, что истощение лимфосистемы до адоптивного переноса опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности терапии благодаря элиминации регуляторных Т-клеток и конкуренции элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). В соответствии с этим, в некоторых вариантах осуществления изобретения проводится стадия истощения лимфосистемы (иногда также называемая «иммуносупрессорным кондиционированием») у пациента перед введением ему TIL после второго размножения или после второго дополнительного размножения (например, таких как TIL, описанных в стадии D на фигуре 11, включая TIL, обозначаемые reREP-TIL) согласно изобретению.

[00318] В основном, истощение лимфосистемы осуществляют с использованием флударабина и/или циклофосфида (активной формы, называемой мафосфамидом) и их комбинаций. Такие методы описаны в

публикациях Gassner et al. (*Cancer Immunol Immunother.* 2011, 60(1):75-85, Muranski, et al., *Nat Clin Pract Oncol.*, 2006 3(12):668-681, Dudley, et al., *J Clin Oncol* 2008, 26:5233-5239, and Dudley, et al., *J Clin Oncol.* 2005, 23(10):2346-2357, содержание которых во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

[00319] В некоторых вариантах осуществления изобретения, флударабин присутствует в концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл (Sigma-Aldrich, MO, USA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, флударабин присутствует в концентрации 1 мкг/мл (Sigma-Aldrich, MO, USA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение флударабином проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, флударабин вводят в дозе 10 мг/кг/день, 15 мг/кг/день, 20 мг/кг/день, 25 мг/кг/день, 30 мг/кг/день, 35 мг/кг/день, 40 мг/кг/день или 45 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение флударабином проводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/день.

[00320] В некоторых вариантах осуществления изобретения, мафосфамид, то есть, активная форма циклофосфамида присутствует в концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, мафосфамид, то есть, активная форма циклофосфамида присутствует в концентрации 1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение циклофосфамидом проводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения, циклофосфамид вводят в дозе 100 мг/м²/день, 150 мг/м²/день, 175 мг/м²/день, 200 мг/м²/день, 225 мг/м²/день, 250 мг/м²/день, 275 мг/м²/день или 300 мг/м²/день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, циклофосфамид вводят внутривенно (то есть, i.v.). В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение циклофосфамидом проводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления изобретения, лечение циклофосфамидом проводят в течение 4-5 дней в дозе 250 мг/м²/день, i.v. В некоторых вариантах осуществления

изобретения, лечение циклофосфамидом проводят в течение 4 дней в дозе 250 мг/м²/день, i.v.

[00321] В некоторых вариантах осуществления изобретения, флударабин и циклофосфамид вводят пациенту вместе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, флударабин вводят в дозе 25 мг/м²/день, i.v., а циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м²/день, i.v., в течение 4 дней.

[00322] Этот протокол включает введение флударабина (25 мг/м²/день, i.v.) и циклофосфамида (250 мг/м²/день, i.v.) в течение 4 дней.

2. Репрезентативные варианты лечения

[00323] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу лечения рака с использованием популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включающему стадии: (a) получения первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента; (b) осуществления первого размножения первой популяции TIL в первой клеточной культуральной среде с получением второй популяции TIL, где вторая популяция TIL по меньшей мере в 5 раз превышает первую популяцию TIL, и где первая клеточная культуральная среда содержит IL-2; (c) осуществления быстрого размножения второй популяции TIL с использованием популяции миелоидных искусственных антигенпрезентирующих клеток (миелоидных аАРС) во второй клеточной культуральной среде с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 раз превышает вторую популяцию TIL через 7 дней после начала быстрого размножения, и где вторая клеточная культуральная среда содержит IL-2 и ОКТ-3; (d) введения пациенту с раком терапевтически эффективной части третьей популяции TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, IL-2 присутствует в исходной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл, а антитело ОКТ-3 присутствует в исходной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй клеточной культуральной среде. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение осуществляют в течение не более, чем 14 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, первое размножение осуществляют с использованием газопроницаемого контейнера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, второе размножение осуществляют с использованием газопроницаемого контейнера. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение второй популяции TIL к популяции аАРС при

быстром размножении составляет 1:80-1:400. В некоторых вариантах осуществления изобретения, отношение второй популяции TIL к популяции aAPC при быстром размножении составляет приблизительно 1:300. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подвергаемый лечению рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом человеческой папилломы, рака головы и шеи, рака почек и почечно-клеточной карциномы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подвергаемый лечению рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичника и рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подвергаемым лечению раком является меланома. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подвергаемым лечению раком является рак яичника. В некоторых вариантах осуществления изобретения, подвергаемым лечению раком является рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ лечения рака также включает стадию лечения пациента путем проведения немиелоабляционного истощения лимфосистемы перед введением пациенту третьей популяции TIL. В некоторых вариантах осуществления изобретения, схема немиелоабляционного истощения лимфосистемы включает стадии введения циклофосфида в дозе 60 мг/м²/день в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/день в течение пяти дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения, схема введения высокой дозы IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг альдеслейкина или его биологического аналога или варианта путем 15-минутного внутривенного введения болюса посредством инфузии через каждые восемь часов до достижения иммунологической толерантности.

3. Способы совместного введения

[00324] В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL, продуцированные как описано в настоящей заявке в Стадиях А-Г, могут быть введены в комбинации с одним или более иммунными регуляторами сверхочных точек, такими как антитела, описанные ниже. Так, например, антителами, которые нацелены на PD-1, и которые могут быть введены вместе с TIL согласно изобретению, являются, но не ограничиваются ими, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), гуманизованное анти-PD-1

антитело JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное анти-PD-1 антитело TSR-042 (Tesarо, Inc.), пидилизумаб (анти-PD-1 mAb CT-011, Medivation), моноклональное анти-PD-1 антитело BGB-A317 (BeiGene), и/или анти-PD-1 антитело SHR-1210 (ShangHai HengRui), человеческое моноклональное антитело REGN2810 (Regeneron), человеческое моноклональное антитело MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизованное анти-PD-1 антитело IgG4 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления изобретения, анти-PD-1 антитело происходит от клона: RMP1-14 (крысиного IgG) - BioXcell cat# BP0146. Другими подходящими антителами для их использования в способах совместного введения с TIL, продуцируемыми в Стадиях А-Ф, описанных в настоящей заявке, являются анти-PD-1 антитела, описанные в патенте США No. 8008449, который вводится в настоящее описание посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения, антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связываются с PD-L1 и ингибируют его взаимодействие с PD-1, что приводит к повышению иммунной активности. Любые известные антитела, которые связываются с PD-L1 и нарушают взаимодействие PD-1 и PD-L1, а также стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, являются подходящими для их применения в способах совместного введения с TIL, продуцируемыми в Стадиях А-Ф, описанных в настоящей заявке. Так, например, антителами, которые нацелены на PD-L1, и которые используются в клинических испытаниях, являются BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие подходящие антитела, которые нацелены на PD-L1, раскрываются в патенте США No. 7943743, который вводится в настоящее описание посредством ссылки. Специалистам известно, что любое антитело, которое связывается с PD-1 или PD-L1, нарушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, является подходящим для его применения в способах совместного введения с TIL, продуцируемыми в Стадиях А-Ф, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидууму вводят комбинацию TIL, продуцированных в Стадиях А-Ф, вместе с анти-PD-1 антителом, если этот пациент страдает раком, который является не восприимчивым к введению только одного анти-PD-1 антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенту вводят TIL в комбинации с анти-PD-1 антителом, если пациент страдает меланомой, не поддающейся лечению. В некоторых вариантах

осуществления изобретения, пациенту вводят TIL в комбинации с анти-PD-1 антителом, если пациент страдает немелкоклеточной карциномой легких (НМККЛ).

4. Адоптивный клеточный перенос

Адоптивный клеточный перенос (АСТ) представляет собой очень эффективную форму иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток, обладающих противоопухолевой активностью, раковым пациентам. АСТ представляет собой способ лечения, который включает идентификацию *in vitro* лимфоцитов с противоопухолевой активностью, *in vitro* размножение этих клеток с получением большего числа клеток и их инфузию хозяину с раковой опухолью. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, могут происходить от стромы вырезанных опухолей (опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов или TIL). TIL для АСТ могут быть получены как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL получают, например, методом, описанным на фигуре 11. Эти клетки могут быть также взяты или выделены из крови в целях их генетической модификации для экспрессии противоопухолевых T-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR), обогащения смешанными культурами опухолевых лимфоцитов (MLTC) или клонирования с использованием аутологичных антигенпрезентирующих клеток и пептидов, происходящих от опухоли. АСТ, при котором лимфоциты, происходящие от хозяина, имеющего раковую опухоль, и предназначенные для инфузии, называются аутологичными АСТ. В публикации заявки США No. 2011/0052530 описан способ адоптивной клеточной терапии для стимуляции регрессии рака, главным образом, для лечения пациентов, страдающих метастазирующей меланомой, и эта заявка во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть введены как описано в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть введены в разовой дозе. Таким введением может быть инъекция, например, внутривенная инъекция. В некоторых вариантах осуществления изобретения, TIL могут быть введены в виде дробных доз. Дозы могут быть введены один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более, чем шесть раз в год. Доза может быть введена один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или через день. При необходимости, введение TIL и/или

цитотоксических лимфоцитов может быть продолжено.

I. Репрезентативные варианты осуществления изобретения

[00325] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включающему:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;

(b) осуществление первого размножения первой популяции TIL в первой клеточной культуральной среде с получением второй популяции TIL, где первая клеточная культуральная среда содержит IL-2;

(c) осуществление быстрого размножения второй популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где вторая клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3 и моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), где быстрое размножение осуществляют по меньшей мере за 14 дней;

(d) удаление клеток из второй клеточной культуральной среды и необязательно криоконсервацию клеток в среде для хранения с получением третьей популяции клеток;

(e) необязательное оттаивание третьей популяции клеток; и

(f) осуществление второго быстрого размножения третьей популяции клеток TIL в третьей клеточной культуральной среде, где третья клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3, и моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), где второе быстрое размножение осуществляют по меньшей мере за 14 дней с получением четвертой популяции TIL, где четвертая популяция TIL имеет большую субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и

g) необязательно, повторение стадии (f) один или более раз.

[00326] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к указанным рестимулированным клеткам, экспрессирующим CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных уровням для свежесобранных клеток.

[00327] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к указанной среде reREP, которая содержит моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

[00328] В одном из вариантов осуществления изобретения, указанные PBMC добавляют к TIL в любой из дней 9-17. В некоторых

вариантах осуществления изобретения, указанные РВМС добавляют к TIL на дни 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 и/или 17.

[00329] В одном из вариантов осуществления изобретения, указанная среда для reREP содержит aAPC.

[00330] В одном из вариантов осуществления изобретения, криоконсервированные TIL были трансдуцированы экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный T-клеточный рецептор.

[00331] В одном из вариантов осуществления изобретения, криоконсервированные TIL трансдуцировали экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий легкую цепь иммуноглобулина, связанную с эндодоменом молекулы, передающей T-клеточный сигнал.

[00332] В одном из вариантов осуществления изобретения, рестимулированные TIL вводят пациенту путем инфузии.

[00333] В одном из вариантов осуществления изобретения, стадия (d) также включает удаление клеток из второй клеточной культуральной среды.

[00334] В одном из вариантов осуществления изобретения, стадию (f) повторяют достаточное число раз до получения количества TIL, достаточного для приготовления терапевтической дозы указанных TIL.

[00335] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к популяции рестимулированных TIL, полученных способами, описанными выше и ниже.

[00336] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к популяции рестимулированных TIL, полученных способом по пункту 1, где указанные рестимулированные TIL имеют базальный уровень гликолиза, который по меньшей мере в два раза превышает базальный гликолиз указанных оттаянных криоконсервированных TIL.

[00337] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу оценки метаболической активности популяции клеток TIL, включающему оценку базального гликолиза указанных клеток.

[00338] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу оценки метаболической активности популяции клеток TIL, включающему оценку базального дыхания указанных клеток.

[00339] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение

относится к способу оценки метаболической активности популяции клеток TIL, включающему оценку недостаточной дыхательной способности (SRC) указанных клеток.

[00340] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу оценки метаболической активности популяции клеток TIL, включающему оценку гликолитического резерва указанных клеток.

[00341] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу лечения рака у пациента с использованием популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включающему стадии:

- a) получения первой популяции TIL, взятых у указанного пациента;
- b) быстрого размножения указанной первой популяции TIL с образованием размноженной популяции TIL;
- c) криоконсервации указанной размноженной популяции с получением криоконсервированной популяции TIL;
- d) оттаивания указанной криоконсервированной популяции TIL;
- e) культивирования указанной криоконсервированной популяции TIL в среде, содержащей IL-2 и анти-CD3 антитело с образованием популяции reREP-TIL; и
- f) введения терапевтически эффективного количества клеток reREP-TIL указанному пациенту.

[00342] В одном из своих вариантов, настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включающему:

- (a) получение первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;
- (b) осуществление первого размножения первой популяции TIL в первой клеточной культуральной среде с получением второй популяции TIL, где первая клеточная культуральная среда содержит IL-2;
- (c) осуществление быстрого размножения второй популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где вторая клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3 и мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), где быстрое размножение осуществляют по меньшей мере за 14 дней;
- (d) удаление клеток из второй клеточной культуральной среды и необязательно криоконсервацию клеток в среде для хранения с

получением третьей популяции клеток;

(e) необязательно, оттаивание третьей популяции клеток;

(f) осуществление второго быстрого размножения третьей популяции клеток TIL в третьей клеточной культуральной среде, где третья клеточная культуральная среда содержит IL-2, ОКТ-3, и моноклеарные клетки периферической крови (PBMC), где второе быстрое размножение осуществляют по меньшей мере за 14 дней с получением четвертой популяции TIL, где четвертая популяция TIL имеет большую субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и

g) введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества клеток reREP-TIL.

[00343] В одном из вариантов осуществления изобретения, стадия d) также включает удаление клеток из второй клеточной культуральной среды.

[00344] В одном из вариантов осуществления изобретения, стадию (f) повторяют достаточное число раз до получения количества TIL, достаточного для приготовления терапевтической дозы указанных TIL.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Протокол рестимуляции

[00345] Как обсуждается в настоящей заявке, протокол и анализ рестимуляции были проведены посредством рестимуляции свежим антигеном после сбора или оттаивания TIL, культивированных способом REP.

[00346] Целью анализа на рестимуляцию, описанного в этом примере, является оценка пролиферации/размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов после REP. После REP, TIL (после Стадии D, описанной на фигуре 11) подвергали рестимуляции аллогенными PBMC-фидерами, анти-CD3 антителом (клоном ОКТ3) и интерлейкином-2 (IL-2). Жизнеспособные клетки подсчитывали на день 7 и регистрировали.

[00347] После REP, TIL (после Стадии D, описанной на фигуре 11) вводили путем инфузии пациентам, которые были предварительно подвергнуты истощению лимфосистемы, для стимуляции выживания TIL и размножения *in vivo*. После повторной инфузии TIL пациенту, эти клетки подвергали контактированию с антигеном, что приводило к активации TIL, однако, эти TIL имели очень короткое время полужизни. Рестимуляция TIL посредством контактирования с

антигеном вместе с обработкой IL-2 во время АСТ могут приводить к пролиферации TIL и к уничтожению опухоли, либо к делеции посредством апоптоза (к клеточной гибели, индуцированной активацией), либо к индуцированию непролиферативного (анергического) состояния из-за отсутствия соответствующей костимуляции. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь отмечают, что рестимуляция TIL после REP (рестимуляция TIL, например, после Стадии D, описанной на фигуре 11) аллогенными PBMC-фидерами может имитировать процесс *in vivo* в результате стимуляции антигеном и цитокинами, необходимыми для размножения TIL. После REP, TIL (после Стадии D, описанной на фигуре 11) активировали мембранными рецепторами на MNC-фидерах, которые связываются с анти-CD3 антителом (с клоном ОКТ3) и перекрестно связываются с TIL в колбе для REP, что приводит к стимуляции размножения TIL.

Пролиферация/размножение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов после REP в анализе на рестимуляцию

[00348] После REP, TIL (после Стадии D, описанной на фигуре 11) подвергали рестимуляции аллогенными PBMC-фидерами, анти-CD3 антителом (клоном ОКТ3) и интерлейкином-2 (IL-2). Жизнеспособные клетки подсчитывали на день 7 и регистрировали.

[00349] В некоторых вариантах осуществления изобретения, эта процедура может быть также проведена для тестирования или подтверждения настоящего протокола REP.

Таблица 3: Определения и аббревиатуры

Аббревиатура	Определение
мкл	Микролитр
АОПИ	Акридиновый оранжевый, иодид пропидия
BSC	Камера биологической безопасности
BSL2	Уровень биологической безопасности 2
CM1	Полная среда для TIL, #1
CM2	Полная среда для TIL, #2; 50:50-смесь CM1 и AIM-V
GMP	Надежная промышленная обработка
Gy	Грей
IPA	Изопропиловый спирт
LN2	Жидкий азот
MNC; PBMC	Мононуклеарные клетки; Мононуклеарные клетки периферической крови

мл	Миллилитры
NA	Отсутствует
NR	Не требуется
ОКТ3	Чистое анти-CD3 антитело MACS® GMP (клон ОКТ3)
PPE	Индивидуальные средства защиты
Pre-REP	Исходные культуры TIL, происходящие от опухолевых фрагментов
REP	Протокол быстрого размножения
SDBB	Банк крови Сан-Диего
TIL	Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

Таблица 4: Материалы

Продукт	Описание	Поставщик	Каталог #	Хранение
AIM-V	GMP	Gibco™/Life Technologies	087-0112DK	2-8°C
Окрашивающий раствор AOPI Cellometer ViaStain™	NA	Nexcelom	CS2-0106	2-8°C
Одноразовый гемацитометр	NA	Nexcelom	CP2-001	RT
CM1	Получали как описано в Примере 5	NA	NA	2-8°C
Рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2) GMP	6×10 ⁶ МЕ/мл маточного раствора, полученного как описано в Примере 4	CellGenix	1020-1000	-20°C
Чистое анти-CD3 антитело MACS® GMP (клон ОКТ3)	GMP	Miltenyi Biotec	170-076- 116	2-8°C
Конические 50 мл- пробирки	Стерильные	Любой источник		КТ
Пипетки для переноса	Стерильные	Любой источник		КТ
Фильтрующая 500 мл-система	Стерильная	EMD/Millipore или эквивалент	SCGPU05RE или эквивалент	КТ
24-луночные планшеты для	Стерильные	Greiner или эквивалент	662160 или эквивалент	КТ

культивирования ткани				
Серологические 5 мл, 10 мл пипетки	Стерильные	Любой источник		КТ
Наконечники для пипеток	Стерильные	Любой источник		КТ

Таблица 5: Образцы

Образец	Описание	Источник	Рег. номер	Хранение
Партии криоконсервированных и гамма-облученных MNC- фидеров	Хранение в холодильнике	SDBB	NA	NA
Клетки TIL после REP	Хранение в холодильнике в свежем или замороженном виде	Iovance Biotechnolo gies	NA	NA

[00350] После REP, TIL (после Стадии D, описанной на фигуре 11) вводили путем инфузии пациентам, которые были предварительно подвергнуты истощению лимфосистемы, для стимуляции выживания TIL и размножения *in vivo*. После повторной инфузии TIL пациенту, эти клетки подвергали контактированию с антигеном, что приводило к активации TIL, однако, эти TIL имели очень короткое время полужизни. Рестимуляция TIL посредством контактирования с антигеном вместе с обработкой IL-2 во время АСТ могут приводить к пролиферации TIL и к уничтожению опухоли, либо к делеции посредством апоптоза (к клеточной гибели, индуцированной активацией), либо к индуцированию непролиферативного (анергического) состояния из-за отсутствия соответствующей костимуляции. Авторами была высказана гипотеза, что рестимуляция TIL после REP аллогенными PBMC-фидерами может имитировать процесс *in vivo* в результате стимуляции антигеном и необходимыми цитокинами для размножения TIL. После REP, TIL активировали мембранными рецепторами на MNC-фидерах, которые связываются с анти-CD3 антителом (с клоном OKT3) и перекрестно связываются с TIL в колбе для REP, что приводит к стимуляции размножения TIL.

Процедура

[00351] Свежие TIL после REP (TIL после стадии D, описанной на фигуре 11) или замороженные TIL после REP (TIL после стадии D, описанной на фигуре 11), которые были оттаяны, один раз промывали в среде CM1. Re-REP (повтор стадии D, описанной на

фигуре 11) культивировали в 24-луночной планшете для культивирования тканей с 2×10^6 MNC-фидерами, 30 нг/мл ОКТ3, 1×10^4 TIL после REP плюс 3000 МЕ/мл rhIL-2 в CM2. Культуры инкубировали в течение семи дней в 5% CO₂ при 37°C в инкубаторе с повышенной влажностью, а затем выделяли живые клетки и подтверждали их жизнеспособность. Кратность размножения TIL определяли по числу жизнеспособных клеток. **ReREP- День 0**

Получение TIL

TIL получали из свежих TIL после REP или из замороженных TIL после REP. Культуры TIL вынимали из инкубатора и переносили в BSC. Затем брали 200 мкл для подсчета клеток на счетчике Cellometer K2. Число клеток регистрировали.

Получение клеток-фидеров

[00352] Для проведения этого протокола необходимо минимум 20×10^6 клеток-фидеров. Каждый 1 мл-сосуд, замороженный в SDBB, имел 100×10^6 жизнеспособных клеток после замораживания. Если допустить, что при оттаивании после хранения LN₂, выход будет составлять 50%, то рекомендуется оттаивать по меньшей мере два сосуда с клетками-фидерами на партию, в результате чего может быть получено 100×10^6 жизнеспособных клеток для каждого REP. Перед оттаиванием клеток-фидеров, приблизительно 50 мл CM2 предварительно нагревали без rhIL-2 для каждой партии тестируемых фидеров. После хранения в LN₂ брали сосуды с определенным числом партий фидеров и эти сосуды помещали на лед. Сосуды переносили в помещение для культивирования тканей. Сосуды оттаивали на водяной бане при 37°C. Сосуды переносили в BSC и наносили 70% EtOH или IPA путем распыления или протирки. С использованием пипетки для переноса, содержимое сосудов с фидерами сразу переносили в 50 мл теплой CM2 в конической 50 мл-пробирке. 200 мкл брали для подсчета клеток на счетчике Cellometer K2. Число клеток регистрировали. Клетки центрифугировали при $350 \times g$ в течение 10 минут. Супернатант и ресуспендированные клетки подвергали аспирации в нужном объеме при плотности 2×10^6 клеток/мл в теплой CM2 плюс 3000 МЕ/мл rhIL-2.

Получение CM2+3000 МЕ/мл рабочего раствора

[00353] Для создания необходимых условий получали достаточное количество CM2. Каждая лунка содержала 2 мл CM2. В каждую лунку добавляли CM2 с 3000 МЕ/мл rhIL-2. Из маточного раствора 6×10^6 МЕ/мл, для каждых 100 мл CM2 требовалось 50 мкл

этого раствора.

Получение чистого рабочего раствора анти-CD3 антитела MACS® GMP CD3 (ОКТ3)

[00354] Маточный раствор ОКТ3 (1 мг/мл) вынимали из холодильника при 4°C. Конечную концентрацию 30 нг/мл ОКТ3 использовали в РЕР. Для получения 2 мл среды СМ2 в каждом 24-луночном планшете требовалось 60 нг ОКТ3. Клетки культивировали с тремя повторностями в следующих условиях: ТИЛ+фидеры, только ТИЛ и только фидеры. Для каждой тестируемой партии фидеров приготавливали 1000 мкл 1:1000-разведения 1 мг/мл ОКТ3 для рабочей концентрации 1 мкг/мл (1000 нг/мл). Для 9 лунок приготавливали 1000 мкл 1:1000-разведения 1 мг/мл ОКТ3. Затем приготавливали 1 мкл 1 мг/мл ОКТ3+999 мкл среды СМ2 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

Приготовление 24-луночного планшета и совместное культивирование

[00355] Для каждого тестируемого ReРЕР требуется 9 лунок 24-луночного планшета.

[00356] На каждом планшете ставили название эксперимента, партию фидеров #, маркировку ТИЛ после РЕР, дату и инициалы оператора. Каждый планшет заполняли компонентами, перечисленными в Таблице 8. Затем добавляли каждый компонент и каждую лунку заполняли общим объемом 2 мл, и планшеты помещали в инкубатор при 37°C. Планшеты 3 раза осторожно перемешивали 1 мл-пипеткой.

Таблица 6: Процедура РЕР в 24-луночном планшете

Порядок добавления в одну лунку 24-луночного планшета	ТИЛ+фидеры+ОКТ3	ТИЛ +ОКТ3	Фидеры+ОКТ3
Клетки ТИЛ (1×10 ⁴ /0,5 мл) в СМ2+ИЛ-2	500 мкл	500 мкл	-
РВМС-фидеры (2×10 ⁶ /1 мл) в СМ2+ИЛ-2	1000 мкл	-	1000 мкл
ОКТ3 (1000 нг/мл) в СМ2+ИЛ-2	60 мкл	60 мкл	60 мкл
СМ2 +ИЛ-2	440 мкл	1440 мкл	940 мкл
Общий объем	2000 мкл	2000 мкл	2000 мкл

Замена среды - День 5

[00357] СМ2 приготавливали с 3000 МЕ/мл rhИЛ-2. Для этого потребовалось 10 мл. Из каждой лунки брали 1 мл среды и откладывали. В каждую лунку с помощью 1 мл-пипетки переносили 1 мл теплой СМ2 с 3000 МЕ/мл rhИЛ-2. Затем планшеты возвращали в

инкубатор.

Сбор - День 7

[00358] С помощью серологической 1 мл-пипетки, содержимое каждой лунки перемешивали для разрушения любых клеточных агрегатов. После тщательного перемешивания клеточной суспензии путем пипетирования, 200 мкл брали для подсчета клеток на счетчике Cellometer K2. Затем подсчитывали клетки и регистрировали данные для всех вариантов: «TIL+фидеры+ОКТ3», «TIL+ОКТ3» и «фидеры+ОКТ3».

[00359] Отдельные ReREP, помимо 24-луночного планшета, осуществляли в 4 вертикальных колбах для культивирования тканей T25 с $1,3 \times 10^7$ MNC-фидеров, 30 нг/мл ОКТ3, $0,65 \times 10^5$ pre-REP-TIL+3000 ME/мл rhIL-2 в CM2. **Примечание:** Следует провести оценку облученных аллогенных клеток-фидеров в соответствии с протоколом быстрого размножения LN-144 (Пример 6).

[00360] Распределение клеток для функциональных анализов:

Таблица 7: Анализ

функциональный анализ	Число клеток/супернатантов культуры
Проточное фенотипирование	10^6
Активность - P815effLuc-eGFP	40^6
Анализ на рестимуляцию гранзимом-В, IFN-гамма	5^6
Метаболизм	2^6
Секвенирование TCR	1^6
Хранение супернатанта культуры TIL+фидеров и только фидеров для мультиплексного ELISA	1 мл

Оценка/Критерии соответствия

Таблица 8: Используемые критерии соответствия

Тест	Критерии соответствия
Размножение TIL	По меньшей мере 50-200-кратное размножение TIL с фидерами после REP
Только RBMC-фидеры	Отсутствие размножения и по меньшей мере 20% снижение общего числа жизнеспособных клеток-фидеров

Стандартные процедуры, включенные в нижеследующие примеры

Таблица 9: Стандартные процедуры

	Название	Номер Примера
--	----------	---------------

	Определение числа клеток и подтверждение жизнеспособности культур TIL на счетчике клеток Cellometer K2	Пример 2
	Получение маточного раствора IL-2 (CellGenix)	Пример 4
	Состав среды CM	Пример 5
	Оценка облученных аллотенных клеток-фидеров в соответствии с протоколом быстрого размножения LN-144	Пример 6
	Расширенный фенотип опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов после REP	Пример 6
	Подтверждение криоамороженного продукта TIL после REP	Примеры 8 и 9

Пример 2: Определение числа клеток и подтверждение жизнеспособности культур til на счетчике клеток cellometer k2

[00361] В этом примере описаны репрезентативные инструкции по проведению процедуры подсчета клеток на автоматическом визуализирующем цитометре Cellometer K2.

[00362] Цель проведения способа: определение общего числа клеток и подтверждение жизнеспособности клеточных культур.

Таблица 10. Определения

мкл	Микролитры
АОПИ	Акридиновый оранжевый, иодид пропидия
BSC	Камера биологической безопасности
DPBS	Забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко
мл	Миллилитры
MNC	Мононуклеарные клетки крови
NA	Отсутствуют
PBMC	Мононуклеарные клетки периферической крови
PPE	Индивидуальные средства защиты
Pre-REP	Исходная культура TIL до проведения протокола быстрого размножения культуры
REP	Протокол быстрого размножения
TIL	Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

Процедура

Получение клеточной суспензии

Приготовление трипанового синего

[00363] Конечная концентрация трипанового синего составляла 0,1%. Производитель рекомендует приготавливать 0,2% маточный раствор. При использовании трипанового синего для подсчета клеток на цитометре Cellometer K2, маточный раствор (0,4%) с PBS разводили до 0,2%. Трипановый синий фильтровали через 0,2-0,4-микронный фильтр и разделяли на аликвоты в небольших объемах в маркированных пробирках с закрытой крышкой. Клеточную суспензию смешивали с 0,2% трипановым синим в отношении 1:1.

Приготовление АОРІ

[00364] При использовании АОРІ для подсчета клеток на цитометре Cellometer K2 получали раствор АОРІ. Образцы клеток окрашивали раствором АОРІ в отношении 1:1. Примечание: при подсчете культур с высокой концентрацией, образцы клеток разводили в клеточной культуральной среде до конечного разведения трипановым синим или АОРІ в отношении 1:1. Для определения наилучшего разведения перед использованием, производитель предлагает провести ряд подсчетов.

Работа на цитометре Cellometer K2

[00365] Включали устройство Cellometer K2. Изображение на визуализирующем цитометре выбирали на мониторе компьютера, подсоединенного к цитометру. При открытии главного окна программы на компьютере выбирали один из Анализов, перечисленных в раскрывающемся блоке списка. При выборе соответствующего анализа, тип клеток и режим визуализации может быть выбран специалистом по собственному усмотрению. В разделе «Образец», после нажатия кнопки данные Пользователя/ID Образца открывается другое окно для ввода оператором информации об образце. Затем вводят «ID пользователя». Эта информация состоит из трехбуквенных инициалов пользователя. Затем вводят «ID образца». ID образца берут из поступившей информации об образце.

Параметры серийного разведения

[00366] Если помимо разведения смеси 1:1 другого разведения не проводили, то коэффициент разведения равен 2. Если разведение проводили до конечного отношения разведения смеси 1:1, то коэффициент разведения в 2 раза превышал предыдущий коэффициент разведения. Коэффициент разведения корректировали в соответствии

с используемой смесью.

Подсчет клеток

[00367] Пластиковую основу удаляли с обеих сторон предметных стекол в камере для подсчета клеток на цитометре (SD100) и помещали поверх чистого оберточного материала, не содержащего частиц пыли. После приготовления клеточной суспензии брали небольшую аликвоту образца и переносили в лунку многолуночного планшета для культивирования клеток или в пробирку. При разведении образца, такое разведение осуществляли с использованием клеточной культуральной среды. В лунку многолуночного планшета для культивирования клеток или в пробирку добавляли 20 мкл клеточной суспензии. 20 мкл 0,2% трипанового синего или раствора AOPI добавляли к 20 мкл клеточной суспензии, и образец тщательно перемешивали. Затем брали 20 мкл 1:1-раствора и переносили на одну сторону камеры для подсчета клеток. Примечание: Не следует дотрагиваться до прозрачной области предметного стекла. При необходимости, образцы снова помещали на другую сторону предметного стекла. Эту камеру вставляли в щель передней части цитометра. Для подсчета клеток с использованием AOPI, на главном экране выбирали «Preview Fl» для предварительного просмотра зеленого флуоресцентного изображения (живых клеток). Для подсчета клеток с использованием трипанового синего выбирали «Preview Brightfield». Для оптимального фокусирования изображения использовали ручной элемент фокусировки. Выбирали клетки, имеющие яркий центр и четкие края. Для начала процедуры подсчета выбирали «Count». Результаты были представлены как результаты подсчета на всплывающем окне экрана компьютера, где показаны результаты подсчета.

Пример 3: Автоматический визуализирующий счетчик клеток cellometer ic2

[00368] В этом примере описана процедура подсчета клеток на автоматическом визуализирующем цитометре Cellometer K2 Image Cytometer.

1. Определения

мкл - Микролитр

АОРІ - Акридиновый оранжевый, иодид пропидия

BSC - Камера биологической безопасности

DPBS - Забуференный фосфатом физиологический раствор
Дульбекко

мл - Миллилитры

MNC - Мононуклеарные клетки крови

NA - отсутствует

PBMC - Мононуклеарные клетки периферической крови

PPE - Индивидуальные средства защиты

Pre-REP - Исходная культура TIL до проведения протокола быстрого размножения культуры

REP - Протокол быстрого размножения

TIL - Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

7. Процедура

7.1. Приготовление клеточной суспензии

7.1.1. Получение трипанового синего

Конечная концентрация трипанового синего составляла 0,1%. Производитель рекомендовал приготовление 0,2% маточного раствора 0,2%.

7.1.1.1. При использовании трипанового синего для подсчета клеток на цитометре Cellometer K2, маточный раствор (0,4%) с PBS разводили до 0,2%.

7.1.1.2. Трипановый синий фильтровали через 0,2-0,4-микронный фильтр и разделяли на аликвоты в небольших объемах в маркированных пробирках с закрытой крышкой.

7.1.1.3. Клеточную суспензию смешивали с 0,2% трипановым синим в отношении 1:1.

7.1.2. Получение АОРІ

7.1.2.1. При использовании АОРІ для подсчета клеток на цитометре Cellometer K2 получали раствор АОРІ.

7.1.2.2. Образец клеток окрашивали раствором АОРІ в отношении 1:1.

Примечание: При подсчете культур с высокой концентрацией, образцы клеток разводили в клеточной культуральной среде до конечного разведения трипановым синим или АОРІ в отношении 1:1. Для определения наилучшего разведения перед использованием,

производитель предлагает провести ряд подсчетов.

7.2. Работа на цитометре Cellometer K2

7.2.1. Включали устройство Cellometer K2.

7.2.2. Изображение на визуализирующем цитометре выбирали на мониторе компьютера, подсоединенного к цитометру.

7.2.3 На главном экране программы выбирали одну из опций Анализа, перечисленных в раскрывающемся блоке списка.

7.2.3.1 При выборе соответствующего Анализа, тип клеток и режим визуализации может быть выбран специалистом по собственному усмотрению.

7.2.3.2. В разделе «Образец», после нажатия кнопки данные Пользователя/ID Образца открывается другое окно для ввода оператором информации об образце.

7.2.3.2.1. Затем вводят «ID пользователя».

7.2.3.2.2. Затем вводят «ID образца». ID образца берут из поступившей информации об образце.

7.2.3.3. Были установлены параметры разведения.

7.2.3.3.1. Если помимо разведения смеси в отношении 1:1 другого разведения не проводили, то коэффициент разведения равен 2.

7.2.3.3.2. Если разведение проводили до конечного разведения смеси 1:1, то коэффициент разведения в 2 раза превышал предыдущий коэффициент разведения.

7.2.3.3.3. Коэффициент разведения корректировали в соответствии со смесью, используемой в опции «разведение» на экране. Для вызова диалогового окна был выбран значок «карандаш».

7.2.3.3.4. Опции «Изображение F1» и «Изображение F2» были подтверждены как идентичные.

7.2.3.3.5. После завершения процедуры была нажата кнопка «Сохранить».

7.3. Подсчет клеток

7.3.1. Пластиковую основу удаляли с обеих сторон предметных стекол в камере для подсчета клеток на цитометре (SD100) и помещали поверх чистого оберточного материала, не содержащего частиц пыли.

7.3.2. После приготовления клеточной суспензии брали небольшую аликвоту образца и переносили в лунку многолуночного планшета для культивирования клеток или в пробирку.

7.3.3. При разведении образца, такое разведение осуществляли с использованием клеточной культуральной среды.

7.3.4. В лунку многолуночного планшета для культивирования клеток или в пробирку добавляли 20 мкл клеточной суспензии.

7.3.5. 20 мкл 0,2% трипанового синего или раствора АОРІ добавляли к 20 мкл клеточной суспензии, и образец тщательно перемешивали.

7.3.6. Брали 20 мкл 1:1-раствора и переносили на одну сторону камеры для подсчета клеток.

Примечание: Не следует дотрагиваться до прозрачной области предметного стекла.

7.3.7. При необходимости, образцы снова помещали на другую сторону предметного стекла. Эту камеру вставляли в щель передней части цитометра.

7.3.8. Для подсчета клеток с использованием АОРІ, на главном экране выбирали «Preview Fl» для предварительного просмотра зеленого флуоресцентного изображения (живых клеток). Для подсчета клеток с использованием трипанового синего выбирали «Preview Brightfield».

7.3.9. Для оптимального фокусирования изображения использовали ручной элемент фокусировки. Выбирали клетки, имеющие яркий центр и четкие края.

7.3.10. Для начала процедуры подсчета выбирали «Count».

7.3.11. Результаты были представлены как результаты подсчета на всплывающем окне экрана компьютера, где показаны результаты подсчета.

Пример 4. Приготовление маточного раствора IL-2 (CELLGENIX)

[00369] В этом примере описана репрезентативная процедура приготовления маточного раствора IL-2.

[00370] Определения/Аббревиатуры

мкл: Микролитры или мкл

BSC: Камера биологической безопасности

BSL2: Уровень биологической безопасности 2

D-PBS: Забуференный фосфатом физиологический раствор
Дульбекко

G: Калибр

GMP: Надежная промышленная обработка

HAc: Уксусная кислота

HSA: Альбумин человеческой сыворотки

мл: Миллититр

NA: отсутствует

PPE: Индивидуальные средства защиты

rhIL-2; IL-2: Рекомбинантный человеческий интерлейкин-2

COA: Сертификат анализа.

6. Процедура

6.1. Приготовление 0,2% раствора уксусной кислоты (HAc).

6.1.1. Перенос 29 мл стерильной воды в коническую 50 мл-пробирку.

6.1.2. Добавление 1 мл 1N уксусной кислоты в коническую 50 мл-пробирку.

6.1.3. Тщательное смешивание путем переворачивания пробирки 2-3 раза.

6.1.4. Стерилизация раствора HAc путем фильтрации с использованием фильтра Steriflip.

6.1.5. Закрытие крышкой, датирование и маркировка «стерильный 0,2% раствор уксусной кислоты».

6.1.6. Истечение срока хранения раствора через 2 месяца. Хранение при комнатной температуре.

6.2. Приготовление 1% HSA в PBS.

6.2.1. Добавление 4 мл 25% маточного раствора HSA к 96 мл PBS в стерильное фильтрующее 150 мл-устройство.

6.2.2. Фильтрация раствора.

6.2.3. Закрытие крышкой, датирование и маркировка «1% HSA в PBS»

6.2.4. Истечение срока хранения раствора через 2 месяца. Хранение при 4°C.

6.3. Создание документа для каждого приготовленного сосуда с rhIL-2.

6.4. Приготовление маточного раствора rhIL-2 (конечная концентрация 6×10^6 МЕ/мл)

6.4.1. Каждая партия rhIL-2 отличается, а поэтому необходима информация, имеющаяся в сертификате анализа от производителя (COA), такая как:

6.4.1.1. Масса rhIL-2 на сосуд (мг)

6.4.1.2. Удельная активность rhIL-2 (МЕ/мг)

6.4.1.3. Рекомендованный объем разведения 0,2% HAc (мл)

6.4.2. Вычисление объема 1% HSA, необходимого для партии rhIL-2 с помощью уравнения, приведенного ниже:

$$\left(\frac{\text{Масса сосуда} \times \text{биологическая активность} \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{мг}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}}} \right) - \text{объем HAc (мл)} = 1\% \text{ объем HSA (мл)}$$

6.4.2.1. Так, например, в соответствии с COA партии rhIL-2 CellGenix 10200121, удельная активность для 1 мг-сосуда составляет 25×10^6 МЕ/мг. Рекомендуется разведение rhIL-2 в 2 мл 0,2% HAc.

$$\left(\frac{1 \text{ мг} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мг}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}}} \right) - 2 \text{ мл} = 2,167 \text{ мл HSA}$$

6.4.3. Протирка резиновой пробки сосуда с IL-2 оберточной тканью, пропитанной спиртом.

6.4.4. Введение в сосуд рекомендуемого объема 0,2% HAc с использованием иглы 16G 3 мл-шприца. Следует не допускать смещения пробки при снятии иглы.

6.4.5. Переворачивание сосуда 3 раза и вихревое размешивание до растворения всего порошка.

6.4.6. Осторожное снятие пробки и помещение ее на оберточную ткань, пропитанную спиртом.

6.4.7. Добавление вычисленного объема 1% HSA в сосуд.

6.4.8. Закрытие сосуда резиновой пробкой.

6.5. Хранение раствора rhIL-2

6.5.1. Для кратковременного хранения (<72 часов), сосуды хранили при 4°C.

6.5.2. Для длительного хранения (>72 часов), содержимое сосудов разделяли на аликвоты с меньшими объемами и хранили в криопробирках при -20°C до использования. Следует избегать циклов замораживания/оттаивания. Срок хранения раствора - 6 месяцев после даты приготовления.

6.5.3. Маркировка Rh-IL-2: название поставщика и номер по каталогу, номер партии, срок хранения, инициалы оператора, концентрация и объем аликвоты.

Пример 5: Приготовление среды перед проведением и во время проведения REP

[00371] В этом примере описана процедура приготовления среды для культивирования ткани в целях ее использования в протоколах, включающих культивирование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), происходящих от опухолей различных типов, включая, но не ограничиваясь ими, метастазирующую меланому, плоскоклеточную карциному головы и шеи, карциному яичника, карциному молочной железы, негативную по трем признакам, и аденокарциному легких. Во многих случаях, эта среда была использована для приготовления любых TIL, описанных в настоящей заявке и в Примерах.

[00372] Определения

мкг - микрограмм

мкм - микрометр

мкМ - микромоль

AIM-V® - бессывороточная среда для культивирования тканей (Thermo Fisher Scientific)

BSC - Камера биологической безопасности

CM1 - Полная среда #1

CM2 - Полная среда #2

CM3 - Полная среда #3

CM4- Полная среда #4

ME или ед. - Международные единицы

мл - миллилитр

мМ - миллимоль

NA - отсутствует

PPE - Индивидуальные средства защиты

Pre-REP - Предварительная процедура быстрого размножения

REP - Процедура быстрого размножения

rhIL-2, IL-2 - Рекомбинантный человеческий интерлейкин-2

RPMI1640 - Среда Roswell Park Memorial Institute, препарат
1640

SOP - Стандартная технологическая процедура

TIL - Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

7. Процедура

7.1. Все процедуры осуществляли стерильным методом в BSC (класс II, тип A2).

7.1.1. До проведения процедуры, поверхность вытяжного шкафа опрыскивали 70% этанолом.

7.1.2. Все предметы и реагенты опрыскивали 70% этанолом до их помещения в шкаф для культивирования ткани.

7.2 Получение 200 мМ-аликвот L-глутамина

7.2.1. L-глутамин поставлялся в больших объемах, чем это необходимо для приготовления сыворотки (например, в объеме 100 мл или 500 мл).

7.2.2. Бутыль с L-глутамином оттаивали на водяной бане при 37°C.

7.2.3. После оттаивания, L-глутамин тщательно перемешивали, поскольку после оттаивания он выпадает в осадок. Следует убедиться, что весь осадок был возвращен в раствор до взятия аликвот.

7.2.4. Аликвоты по 5-10 мл L-глутамина вводили в стерильные конические 15 мл-пробирки.

7.2.5. Пробирки маркировали с указанием концентрации, поставщика, номера партии, даты получения аликвоты и срока хранения.

7.2.6. Пробирки хранили при -20°C и вынимали, если это необходимо для приготовления среды.

7.3. Приготовление CM1

7.3.1. Нижеследующие реагенты брали из холодильника и нагревали на водяной бане при 37°C:

7.3.1.1. RPMI1640

7.3.1.2. Человеческая сыворотка АВ

7.3.1.3. 200 мМ L-глутамин

7.3.2. Брали ВМЕ, хранившийся при 4°C, и помещали в шкаф для культивирования ткани.

7.3.3. Маточный раствор гентамицина, хранившийся при комнатной температуре, помещали в шкаф для культивирования ткани.

7.3.4. Среду СМ1, описанную ниже в Таблице 1, приготавливали путем добавления каждого ингредиента в верхнюю секцию 0,2 мкм-фильтра до соответствующего объема.

Таблица 11. Приготовление СМ1

Ингредиент	Конечная концентрация	Конечный объем 500 мл	Конечный объем 1 л
RPMI1640	NA	450 мл	900 мл
10% термоинактивированная человеческая сыворотка АВ	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ ВМЕ	55 мкМ	0,5 мл	1 мл
50 мг/мл сульфата гентамицина	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

7.3.5. Бутыль со средой СМ1 маркировали с указанием названия, инициалов составителя, даты фильтрации/приготовления, срока хранения, который составлял две недели, и эту бутыль хранили при 4°C до культивирования тканей. Среду разделяли на аликвоты и помещали в бутыли меньшего объема, если это необходимо.

7.3.6. Любые остальные RPMI1640, человеческую сыворотку АВ или L-глутамин хранили при 4°C до следующего приготовления среды.

7.3.7. Бутыль с маточным раствором ВМЕ снова помещали на хранение при 4°C.

7.3.8. Бутыль с маточным раствором гентамицина снова помещали на хранение при комнатной температуре.

7.3.9. Из-за ограниченной забуферивающей емкости среды, СМ1 откладывали не более, чем на две недели после приготовления, или после того, как индикатор рН, а именно феноловый красный, не указывал на сильный сдвиг рН (от ярко-красного до розового

цвета).

7.3.10. В день использования, требуемое количество СМ1 нагревали на водяной бане при 37°C и добавляли 6000 МЕ/мл IL-2.

7.3.11. Дополнительная процедура, если это было необходимо

7.3.11.1. В СМ1 добавляли GlutaMAX®

7.3.11.1.1. СМ1 приготавливали путем замены 2 мМ глутамин на 2 мМ GlutaMAX™ (конечную концентрацию см. Таблицу 2). После проведения этой процедуры, бутылку со средой маркировали как «2 мМ GlutaMAX», чтобы не перепутать ее со стандартной средой СМ1.

7.3.11.2. В СМ1 добавляли дополнительные антибиотики/противогрибковые средства.

7.3.11.2.1. В некоторые среды СМ1 требуется добавление дополнительных антибиотиков или противогрибковых средств для предотвращения загрязнения pre-REP-TIL, культивированных из опухолей некоторых типов.

7.3.11.2.2. Антибиотики/противогрибковые средства добавляли до конечных концентраций, указанных ниже в Таблице 2.

7.3.11.2.3. После проведения этой процедуры, бутылку со средой маркировали с указанием дополнительных антибиотиков/противогрибковых средств, чтобы не перепутать ее со стандартной средой СМ1.

8. Таблица 12. Дополнительные добавки в СМ1, если это необходимо

Добавка	Концентрация маточного раствора	Разведение	Конечная концентрация
GlutaMAX™	200 мМ	1:100	2 мМ
Пенициллин/стрептомицин	10000 ед./мл пенициллина, 10000 мкг/мл стрептомицина	1:100	100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина
Амфотерицин В	250 мкг/мл	1:100	2,5 мкг/мл

8.1. Приготовление СМ2

8.1.1. Приготовленную среду СМ1 брали из холодильника или приготавливали свежую СМ1, как описано выше в Примере.

8.1.2. AIM-V® брали из холодильника.

8.1.3. Приготавливали необходимое количество СМ2 путем смешивания приготовленной СМ1 с равным объемом AIM-V® в стерильной бутылки со средой.

8.1.4. Добавляли 3000 МЕ/мл IL-2 в среду СМ2 на день использования.

8.1.5. Приготавливали достаточное количество CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2 на день использования.

8.1.6. Бутыль со средой CM2 маркировали с указанием названия, инициалов составителя, даты фильтрации/приготовления, срока хранения, который составлял две недели, и эту бутылку хранили при 4°C до культивирования тканей. Среду разделяли на аликвоты и помещали в бутылки меньшего объема, если это необходимо.

8.1.7. Любую CM2 без IL-2 возвращали в холодильник, где ее хранили в течение периода времени до двух недель или после того, как индикатор pH, а именно феноловый красный, не указывал на сильный сдвиг pH (от ярко-красного до розового цвета).

8.2. Приготовление CM3

8.2.1. CM3 приготавливали в день использования.

8.2.2. CM3 была аналогична среде AIM-V®, за исключением того, что в день использования в нее добавляли 3000 МЕ/мл IL-2.

8.2.3. CM3 приготавливали в количестве, достаточном для проведения эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 непосредственно в бутылку или пакет с AIM-V. Среду тщательно перемешивали путем осторожного встряхивания. Бутылку маркировали как «3000 МЕ/мл IL-2» сразу после добавления к AIM-V. При избытке CM3, ее хранили в бутылках при 4°C, маркированных с указанием названия среды, инициалов составителя, даты приготовления среды и срока хранения (который составлял 7 дней после приготовления).

8.2.4. В отложенную среду добавляли IL-2 после хранения в течение 7 дней при 4°C.

8.3. Приготовление CM4

8.3.1. CM4 была аналогична среде CM3, за исключением того, что в нее добавляли 2 mM GlutaMAX™ (конечная концентрация).

8.3.1.1. В каждый 1 л CM3 добавляли 10 мл 200 mM GlutaMAX™.

8.3.2. CM4 приготавливали в количестве, достаточном для проведения эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 и маточного раствора GlutaMAX™ непосредственно в бутылку или пакет с AIM-V. Среду тщательно перемешивали путем осторожного встряхивания.

8.3.3. Бутылку маркировали как «3000 МЕ/мл IL-2 и GlutaMAX» сразу после добавления к AIM-V.

8.3.4. При избытке CM4, ее хранили в бутылках при 4°C, маркированных с указанием названия среды «GlutaMAX», инициалов

составителя, даты приготовления среды и срока хранения (который составлял 7 дней после приготовления).

8.3.5. В отложенную среду добавляли IL-2 после хранения в течение 7 дней при 4°C.

Пример 6: Оценка облученных аллогенных клеток-фидеров для проведения протокола быстрого размножения LN-144

[00373] В этом примере кратко описана новая процедура качественной оценки отдельных партий гамма-облученных моноклеарных клеток периферической крови (PBMC, также известных как MNC) для использования в качестве аллогенных клеток-фидеров в описанных здесь репрезентативных способах.

[00374] Каждую партию облученных MNC-фидеров брали у конкретного донора. Каждую партию или каждого донора по отдельности обследовали на размножение TIL в REP в присутствии очищенного анти-CD3 антитела (клона OKT3) и интерлейкина-2 (IL-2). Кроме того, каждую партию клеток-фидеров тестировали без добавления TIL для того, чтобы убедиться, что полученная доза гамма-излучения будет достаточной для сообщения этим клеткам некомпетентности по репликации.

Определения

- AOP1 - Акридиновый оранжевый/иодид пропидия
- BSC - Камера биологической безопасности
- CD3 - Кластер дифференцировки 3; белок-маркер поверхности Т-лимфоцитов
- CF - Мощность центрифуги
- CM1 - Полная среда для TIL, #1
- CM2 - Полная среда для TIL, #2
- CMO - Организация по заключению промышленных контрактов
- CO₂ - Диоксид углерода
- EtOH - этиловый спирт
- GMP - Стандартная промышленная практика
- Gy - Грей (Гр)
- IL-2 - Интерлейкин-2
- IU (ME) - Международные единицы
- LN2- Жидкий азот
- Mini-REP - Мини-протокол быстрого размножения
- мл - миллилитр
- MNC - Моноклеарные клетки
- NA - отсутствует
- OKT3 - Чистое анти-CD3 антитело MACS GMP (клон OKT3)

- PPE - Средства индивидуальной защиты
- Pre-REP - До проведения протокола быстрого размножения
- QS - Quantum Satis; достижение достаточного количества
- REP - Протокол быстрого размножения
- TIL - Опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов
- T25 - Колба для культивирования ткани 25 см²
- мкг - Микрограммы
- мкл - микролитры

Оборудование, программное обеспечение, материалы

[00375] Оборудование

- BSC (камера биологической безопасности)
- Холодильник с жидким азотом
- Водяная баня с регулируемой температурой
- Центрифуга с качающимся корзиночным ротором
- Инкубатор для культивирования ткани с повышенной

влажностью

- Вспомогательная пипетка
- 2-20 мкл-дозатор
- 20-200 мкл-дозатор
- 100-1000 мкл-дозатор
- Автоматический счетчик клеток

[00376] Материалы

- Конические центрифужные 15 мл-пробирки, стерильные
- Конические центрифужные 50 мл-пробирки, стерильные
- CM1
- CM2
- Среда AIM-V CTS (терапевтической чистоты)
- Раствор для окрашивания в счетчике клеток
- IL-2
- Чистое анти-CD3 антитело MACS GMP (клон OKT3)
- Стерильные одноразовые серологические пипетки
- Стерильные одноразовые пипетки для переноса
- Стерильные наконечники пипеток
- 24-луночный планшет для культивирования ткани
- Колбы T25 (Greiner # 690175)
- 5.3.14. Пакеты для хранения с застежками «молния».

Процедура

Общее описание

[00377] Гамма-облученные MNC-фидеры, рост котоых был прекращен, были необходимы для размножения TIL способом REP

(Стадия D). Мембранные рецепторы на MNC-фидерах связывались с анти-CD3 антителом (клоном ОКТ3) и перекрестно связывались с TIL в колбе для REP (Стадия D), что стимулировало размножение TIL. Партии фидеров получали после лейкофереза цельной крови, взятой у конкретных доноров. Продукт лейкофереза подвергали центрифугированию на Фиколле-Гипаке, промывали, облучали и подвергали криоконсервации в условиях GMP.

[00378] Важно отметить, что пациентам, которые проходили TIL-терапию, не вливали жизнеспособные клетки-фидеры, поскольку это может приводить к развитию заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD). Поэтому культивирование клеток-фидеров прекращали путем гамма-облучения клеток соответствующей дозой, что приводило к разрыву двухцепочечной ДНК и к потере жизнеспособности клеток MNC после повторного культивирования.

Критерии оценки и протокол эксперимента

[00379] Партии фидеров оценивали по двум критериям: 1) по их способности стимулировать размножение TIL при совместном культивировании >100 раз и 2) их некомпетентности по репликации.

[00380] Партии фидеров тестировали в формате мини-REP с использованием двух первичных линий pre-REP-TIL, культивированных в вертикальных колбах для культивирования ткани T25. Партии фидеров тестировали по сравнению с двумя отдельными линиями TIL, поскольку каждая линия TIL обладала уникальной способностью пролиферироваться в ответ на активацию при REP. В качестве контроля использовали партию облученных MNC-фидеров, которые как уже было показано ранее, удовлетворяли критериям (1) и (2): (1) способности стимулировать размножение TIL при совместном культивировании >100 раз и (2) их некомпетентности по репликации во всех тестируемых партиях.

[00381] Для гарантии того, что все партии, протестированные в одном эксперименте, дадут эквивалентные результаты, для тестирования во всех условиях и всех партий фидеров использовали достаточное количество маточных растворов одних и тех же линий pre-REP TIL. Для тестирования каждой партии клеток-фидеров брали всего шесть колб T25:

- Линия Pre-REP TIL #1 (2 колбы)
- Линия Pre-REP TIL #2 (2 колбы)
- Контрольные фидеры (2 колбы)
- Примечание: Колбы, содержащие линии TIL #1 и #2, оценивали на способность партии фидеров стимулировать

размножение TIL. Колбы с контрольными фидерами оценивали на некомпетентность партии фидеров по репликации.

Протокол эксперимента

День -2/3, оттаивание линий TIL

[00382] Среду CM2 получали как описано в Примере 5 под заголовком «Приготовление среды перед проведением REP и во время REP». CM2 нагревали на водяной бане при 37°C. В 40 мл полученной CM2 добавляли 3000 ME/мл IL-2. Среду хранили в теплом виде до использования. 20 мл предварительно нагретой CM2 без IL-2 помещали в каждую из двух конических 50 мл-пробирок, маркированных с указанием названия используемых линий TIL. Две отдельных линии pre-REP-TIL, хранящихся в LN₂, переносили в сосуды, которые хранили в камере для культивирования тканей. Линию TIL регистрировали с указанием идентификационного номера. Сосуды оттаивали путем их помещения на хранение в герметично закрытый пакет с застежкой «молния» на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не оставалось небольшое количество льда. Оттаянные сосуды, которые были опрысканы 70% этанолом или протерты тканью, пропитанной 70% этанолом, переносили в BSC. Содержимое сосуда сразу переносили стерильной пипеткой для переноса в 20 мл CM2 в приготовленной маркированной конической 50 мл-пробирке. QS (необходимый объем) доводили до 40 мл с использованием CM2 без IL-2 для промывки клеток. Затем центрифугировали при 400× CF в течение 5 минут. Супернатант удаляли путем аспирации и ресуспендировали в 5 мл теплой CM2, в которую добавляли 3000 ME/мл IL-2. Затем брали небольшую аликвоту (20 мкл) в дубликate для подсчета клеток на автоматическом счетчике клеток. Полученное количество регистрировали. При подсчете, коническую 50 мл-пробирку с клетками TIL помещали в инкубатор с повышенной влажностью при 37°C в 5% CO₂, причем, крышку закрывали неплотно для осуществления газообмена. Затем определяли концентрацию клеток и разводили TIL до 1×10^6 клеток/мл в CM2, в которую добавляли IL-2 в концентрации 3000 ME/мл. После этого проводили культивирование в 2 мл/лунку 24-луночного планшета для культивирования ткани во многих лунках, если это необходимо, в инкубаторе с повышенной влажностью при 37°C до дня 0 мини-REP. Различные линии TIL культивировали в отдельных 24-луночных планшетах для культивирования ткани во избежание путаницы и возможного перекрестного загрязнения.

День 0, начало мини-REP

[00383] Среду CM2 приготавливали в количестве, достаточном для получения нужного числа тестируемых партий фидеров (например, для однократного тестирования 4 партий фидеров приготавливали 800 мл среды CM2). Затем брали аликвоту части CM2, как описано в Примере 5, и добавляли 3000 МЕ/мл IL-2 для культивирования клеток (например, для однократного тестирования 4 партий фидеров приготавливали 500 мл среды CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2). Остаток среды CM2 без IL-2 использовали для промывки клеток как описано ниже.

Получение TIL

7.3.2.4. Работу с каждой линией TIL проводили отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения, где 24-луночный планшет с культурой TIL удаляли из инкубатора и переносили в BSC.

7.3.2.5. С помощью стерильной пипетки для переноса или 100-1000 мкл-дозаторов и наконечника, брали приблизительно 1 мл среды из каждой используемой лунки с TIL и помещали в неиспользованную лунку 24-луночного планшета для культивирования ткани. Эта процедура была проведена для промывки лунок.

7.3.2.6. С использованием новой стерильной пипетки для переноса или 100-1000 мкл-дозаторов и наконечника, остаточную среду смешивали с TIL в лунках для ресуспендирования клеток, а затем клеточную суспензию переносили в коническую 50 мл-пробирку, маркированную с указанием названия TIL и регистрацией объема.

7.3.2.7. Лунки промывали резервной средой и переносили в ту же самую коническую 50 мл-пробирку до достижения нужного объема.

7.3.2.8. Клетки центрифугировали при $400 \times \text{CF}$ для сбора клеточного осадка.

7.3.2.9. Супернатант среды отсасывали и клеточный осадок ресуспендировали в 2-5 мл среды CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2; используемый объем вычисляли исходя из числа собранных лунок и количества осадка, и такой объем был достаточным для достижения концентрации $>1,3 \times 10^6$ клеток/мл.

7.3.2.10. С использованием серологической пипетки, клеточную суспензию тщательно смешивали и регистрировали объем.

7.3.2.11. Брали 200 мкл клеток для их подсчета на автоматическом счетчике клеток.

7.3.2.12. При подсчете, коническую 50 мл-пробирку с клетками TIL помещали в инкубатор с повышенной влажностью при 37°C в 5% CO_2 , причем, крышку закрывали неплотно для

осуществления газообмена.

7.3.2.13. Число клеток регистрировали.

7.3.2.14. Коническую 50 мл-пробирку, содержащую клетки TIL, вынимали из инкубатора и ресуспендировали в концентрации $1,3 \cdot 10^6$ клеток/мл в теплой SM2 с добавлением 3000 ME/мл IL-2. Коническую 50 мл-пробирку возвращали в инкубатор с неплотно закрытой крышкой.

7.3.2.15 При необходимости, исходный 24-луночный планшет хранили для рекультивирования любых остаточных TIL.

7.3.2.16. Стадии 7.3.2.4-7.3.2.15 повторяли для второй линии TIL.

7.3.2.17. Непосредственно перед высеванием TIL в колбы T25 для эксперимента, TIL разводили 1:10 до конечной концентрации $1,3 \times 10^5$ клеток/мл как описано ниже в стадии 7.3.2.35.

Приготовление чистого рабочего раствора MACS GMP CD3 (ОКТ3)

7.3.2.18. Маточный раствор ОКТ3 (1 мг/мл) вынимали из холодильника при 4°C и помещали в BSC.

7.3.2.19. В среде для мини-REP использовали конечную концентрацию 30 нг/мл ОКТ3.

7.3.2.20. 600 нг ОКТ3 было необходимо для получения 20 мл в каждой экспериментальной колбе T25; это количество эквивалентно 60 мкл 10 мкг/мл раствора для каждых 20 мл или 360 мкл во всех 6 колбах, тестируемых для каждой партии фидеров.

7.3.2.21. Для каждой тестируемой партии фидеров получали 400 мкл в разведении 1:100 1 мг/мл ОКТ3 для рабочей концентрации 10 мкг/мл (например, для однократного тестирования 4 партий фидеров получали 1600 мкл разведения 1:100 1 мг/мл ОКТ3: 16 мкл 1 мг/мл ОКТ3+1,584 мл среды SM2 с 3000 ME/мл IL-2).

Приготовление колб T25

7.3.2.22. Каждую колбу маркировали с указанием названия тестируемой линии TIL, числа репликаторов в колбах, номера партии фидеров, даты и инициалов аналитика.

7.3.2.23. Колбу заполняли средой SM2 перед получением клеток-фидеров.

7.3.2.24. Колбы помещали в инкубатор с повышенной влажностью при 37°C в 5% CO₂, и эту среду поддерживали в теплом состоянии вплоть до добавления остальных компонентов.

7.3.2.25. После получения клеток-фидеров, к SM2 в каждой колбе добавляли компоненты, как описано ниже в Таблице 14 под заголовком «Подготовка колбы».

Таблица 13: Подготовка колбы

Компонент	Объем при совместном культивировании	Объем в контрольных колбах (только с фидерами)
CM2 + 3000 ME/мл IL-2	18 мл	19 мл
MNC: $1,3 \times 10^7$ /мл в CM2 + 3000 ME IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^7$ /колбу)	1 мл	1 мл
OKT3: 10 мкг/мл в CM2 + 3000ME IL-2	60 мкл	60 мкл
TIL: $1,3 \times 10^5$ /мл в CM2 с 3000ME IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^5$ /колбу)	1 мл	0

Получение клеток-фидеров

7.3.2.26. Для проведения этого протокола необходимо минимум 78×10^6 клеток-фидеров на тестируемую партию. Каждый 1 мл-сосуд, замороженный в SDBB, имел 100×10^6 жизнеспособных клеток после замораживания. Если допустить, что при оттаивании после хранения в LN2, выход будет составлять 50%, то рекомендуется оттаивать по меньшей мере два 1 мл-сосуда с клетками-фидерами на партию, в результате чего может быть получено 100×10^6 жизнеспособных клеток для каждого REP. Альтернативно, если брать 1,8 мл-сосуды, то для получения достаточного количества клеток-фидеров можно использовать лишь один сосуд.

7.3.2.27. Перед оттаиванием клеток-фидеров, приблизительно 50 мл CM2, предварительно нагретой без IL-2, использовали для каждой партии тестируемых фидеров.

7.3.2.28. После хранения в LN2, брали сосуды с определенным числом партий фидеров и помещали в пакет с застежкой «молния», и этот пакет помещали на лед для хранения. Сосуды переносили в помещение для культивирования тканей.

7.3.2.29. Сосуды оттаивали в закрытом пакете с застежкой-молнией для хранения путем погружения этого пакета в водяную баню при 37°C.

7.3.2.30. Сосуды вынимали из пакета с застежкой-молнией, а затем опрыскивали 70% EtOH или протирали ткань, пропитанной 70% EtOH, и сосуды переносили в BSC.

7.3.2.31. С использованием пипетки для переноса, содержимое сосудов с фидерами сразу переносили в 30 мл теплой CM2 в коническую 50 мл-пробирку. Сосуд промывали небольшим объемом CM2 для удаления любых остаточных клеток из сосуда.

7.3.2.32. Центрифугировали при $400 \times CF$ в течение 5 минут.

7.3.2.33. Супернатант отсасывали и ресуспендировали в 4 мл теплой SM2+3000 ME/мл IL-2.

7.3.2.34. Брали 200 мкл клеток для их подсчета на автоматическом счетчике клеток. Число клеток регистрировали.

7.3.2.35. Клетки ресуспендировали при плотности $1,3 \times 10^7$ клеток/мл в теплой SM2+3000 ME/мл IL-2.

Подготовка к совместному культивированию

7.3.2.36. Клетки TIL разводили с $1,3 \times 10^6$ клеток/мл до $1,3 \times 10^5$ клеток/мл. Работу с каждой линией TIL следует проводить отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения.

7.3.2.36.1. 4,5 мл среды SM2 добавляли в коническую 15 мл-пробирку.

7.3.2.36.2. Клетки TIL удаляли из инкубатора и тщательно ресуспендировали с использованием серологической 10 мл-пипетки.

7.3.2.36.3. 0,5 мл клеток брали из $1,3 \times 10^6$ клеток/мл суспензии TIL и добавляли к 4,5 мл среды в коническую 15 мл-пробирку. Сосуд с маточным раствором TIL возвращали в инкубатор.

7.3.2.36.4. Тщательно перемешивали.

7.3.2.36.5. Стадии 7.3.2.36.1-7.3.2.36.4 повторяли для второй линии TIL.

7.3.2.36.6. При тестировании более, чем одной партии фидеров за один раз, TIL разводили до более низкой концентрации для каждой партии фидеров непосредственно перед посевом TIL.

7.3.2.37. Колбы с предварительно нагретой средой для одной партии фидеров переносили из инкубатора в BSC.

7.3.2.38. Клетки-фидеры смешивали путем пипетирования вверх и вниз несколько раз с помощью наконечника 1 мл-пипетки и 1 мл ($1,3 \times 10^7$ клеток) переносили в каждую колбу для этой партии фидеров.

7.3.2.39. 60 мкл рабочего маточного раствора ОКТ3 (10 мкг/мл) добавляли в каждую колбу.

7.3.2.40. Две контрольных колбы возвращали в инкубатор.

7.3.2.41. 1 мл ($1,3 \times 10^5$) каждой партии TIL переносили в соответствующим образом маркированную колбу T25.

7.3.2.42. Колбы возвращали в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении. Эти колбы не трогали до дня 5.

7.3.2.43. Стадии 7.3.2.36-7.3.2.42 повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

7.3.3. День 5, замена среды

7.3.3.1. CM2 приготавливали с 3000 ME/мл IL-2. Для каждой колбы требовалось 10 мл.

7.3.3.2. Для предотвращения перекрестного загрязнения, колбы для одной партии фидеров на время откладывали. Колбы вынимали из инкубатора и переносили в BSC, причем, клеточный слой на дне колбы не трогали.

7.3.3.3. 10 мл среды осторожно вынимали из колбы и откладывали.

7.3.3.4. Эту процедуру повторяли для всех колб, включая контрольную колбу.

7.3.3.5. С помощью 10 мл-пипетки, 10 мл теплой CM2 с 3000 ME/мл IL-2 переносили в каждую колбу.

7.3.3.6. Колбы возвращали в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 7.

7.3.3.7. Стадии 7.3.3.1-7.3.3.6 повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

7.3.4. День 7, сбор

7.3.4.1. Для предотвращения перекрестного загрязнения, колбы для одной партии фидеров на время откладывали.

7.3.4.2. Колбы вынимали из инкубатора и переносили в BSC, причем, клеточный слой на дне колбы не трогали.

7.3.4.3. Не нарушая рост клеток на дне колб, из каждой тестируемой колбы брали 10 мл среды, а из каждой контрольной колбы брали 15 мл среды.

7.3.4.4. С помощью серологической 10 мл-пипетки, клетки ресуспендировали в оставшейся среде и тщательно перемешивали для разрушения любых клеточных агрегатов.

7.3.4.5. Объемы для каждой колбы регистрировали на 7-й день.

7.3.4.6. После тщательного перемешивания клеточной суспензии с помощью пипетки, брали 200 мкл для подсчета клеток.

7.3.4.7. TIL подсчитывали с помощью соответствующей стандартной технологической процедуры в комбинации с автоматическим оборудованием для подсчета клеток.

7.3.4.8. Число клеток регистрировали на день 7.

7.3.4.9. Стадии 7.3.4.1-7.3.4.8 повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

7.3.4.10. Контрольные колбы с фидерами оценивали на некомпетентность по репликации, и колбы, содержащие TIL, оценивали на кратность размножения со дня 0 в соответствии с критериями, перечисленными на фигуре 2.

7.3.5. День 7. Продолжение стадий для контрольных колб с фидерами до дня 14

7.3.5.1. После завершения подсчета контрольных колб с фидерами на день 7, в каждую контрольную колбу добавляли 15 мл свежей среды CM2, содержащей 3000 ME/мл IL-2.

7.3.5.2. Контрольные колбы возвращали в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 14.

7.3.6. День 14, Контрольные колбы с размноженными непролиферирующимися фидерами

7.3.6.1. Для предотвращения перекрестного загрязнения, колбы для одной партии фидеров на время откладывали.

7.3.6.2. Колбы вынимали из инкубатора и переносили в BSC, причем, клеточный слой на дне колбы не трогали.

7.3.6.3. Не нарушая рост клеток на дне колб, из каждой контрольной колбы брали приблизительно 17 мл среды.

7.3.6.4. С помощью серологической 5 мл-пипетки, клетки ресуспендировали в оставшейся среде и тщательно перемешивали для разрушения любых клеточных агрегатов.

7.3.6.5. Объемы для каждой колбы регистрировали.

7.3.6.6. После тщательного перемешивания клеточной суспензии с помощью пипетки брали 200 мкл для подсчета клеток.

7.3.6.7. TIL подсчитывали с помощью соответствующей стандартной технологической процедуры в комбинации с автоматическим оборудованием для подсчета клеток.

7.3.6.8. Число клеток регистрировали на день 14.

7.3.6.9. Стадии 7.3.4.1-7.3.4.8 повторяли для всех тестируемых партий фидеров.

Ожидаемые результаты и критерии соответствия

Ожидаемые результаты

[00384] Доза гамма-облучения была достаточной для сообщения клеткам-фидерам некомпетентности по репликации. Все партии, как и ожидалось, удовлетворяли критериям оценки, а также продемонстрировали снижение общего числа жизнеспособных клеток-фидеров, оставшихся на день 7 в культуре REP по сравнению с днем 0.

[00385] Ожидалось, что все партии фидеров удовлетворяли критериям оценки, а именно, 100-кратному размножению TIL на день 7 в культуре REP.

[00386] Как и ожидалось, процедура подсчета фидеров на день 14, является продолжением процедуры подсчета непролиферирующих

клеток, проводимой на день 7.

Критерии соответствия

[00387] Нижеследующие критерии соответствия удовлетворяли каждой тестируемой линии TIL репликата для каждой партии клеток-фидеров.

Соответствие было двухкратным как показано ниже (как проиллюстрировано на фигуре 2, Критерии соответствия):

[00388] Проводили оценку для того, чтобы определить, является ли доза облучения достаточной для сообщения MNC-фидерам некомптентности по репликации при их культивировании в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2.

[00389] Некомптентность по репликации оценивали по общему числу жизнеспособных клеток (TVC), определенному путем автоматического подсчета клеток на день 7 и на день 14 REP.

[00390] Критерии соответствия, а именно, «отсутствие роста» означает, что общее число жизнеспособных клеток не увеличивалось на день 7 и на день 14 по сравнению с исходным числом жизнеспособных клеток, культивированных на день 0 REP.

Оценка способности клеток-фидеров поддерживать размножение TIL.

[00391] Рост TIL оценивали как кратное размножение жизнеспособных клеток после начала культивирования от дня 0 REP до дня 7 REP.

[00392] На день 7, культуры TIL обнаруживали минимум 100-кратное размножение (то есть, это означает, что число клеток более, чем в 100 раз превышало общее число жизнеспособных клеток TIL, культивированных на день 0 REP), как было оценено путем автоматического подсчета клеток.

[00393] Партии MNC-фидеров, которые не удовлетворяли двум вышеуказанным критериям, обычно исключали.

[00394] Любые партии MNC-фидеров, которые удовлетворяли критериям соответствия, но которые по оценкам специалистов обладали недостаточной способностью стимулировать размножение TIL по сравнению с другими предыдущими партиями фидеров, тестируемыми одновременно с аналогичными pre-REP-линиями TIL, как было оценено специалистами, могут быть исключены. Используемые критерии соответствия представлены ниже в Таблице 15.

Таблица 14: Критерии соответствия

Тест	Критерии соответствия
Облучение MNC/Некомптентность по репликации	Рост не наблюдался на дни 7 и 14 дней
Размножение TIL	По меньшей мере 100-кратное размножение каждые TIL (минимум $1,3 \times 10^7$ жизнеспособных клеток)

[00395] Проводили оценку для того, чтобы определить, является ли доза облучения достаточной для сообщения MNC-фидерам некомптентности по репликации при их культивировании в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2.

10.2.2.1.1. Некомптентность по репликации оценивали по общему числу жизнеспособных клеток (TVC), определенному путем автоматического подсчета клеток на день 7 и на день 14 REP.

10.2.2.1.2. Критерии соответствия, а именно, «отсутствие роста» означает, что общее число жизнеспособных клеток не увеличивалось на день 7 и на день 14 по сравнению с исходным числом жизнеспособных клеток, культивированных на день 0 REP.

10.2.2.2. Оценивали способность клеток-фидеров поддерживать размножение TIL.

10.2.2.2.1. Рост TIL оценивали как кратное размножение жизнеспособных клеток после начала культивирования от дня 0 REP до дня 7 REP.

10.2.2.2.1. На день 7, культуры TIL обнаруживали минимум 100-кратное размножение (то есть, это означает, что число клеток более, чем в 100 раз превышало общее число жизнеспособных клеток TIL, культивированных на день 0 REP), как было оценено путем автоматического подсчета клеток.

10.2.2.3. Если партия не удовлетворяла двум вышеуказанным критериям, то эту партию снова тестировали в соответствии с протоколом оценки сопряженности, представленным ниже в Разделе 10.3.

10.2.2.4. После повторного тестирования партии, не удовлетворяющей нужным критериям, любые партии MNC-фидеров, которые не удовлетворяли двум критериям соответствия при исходной оценке и при оценке сопряженности, исключали.

10.2.2.5. Любые партии MNC-фидеров, которые удовлетворяли критериям соответствия, но которые по оценкам специалистов обладали недостаточной способностью стимулировать размножение TIL по сравнению с другими предыдущими партиями фидеров, тестируемыми одновременно с аналогичными pre-REP-линиями TIL,

как было оценено специалистами, были, по возможности, исключены.

[00396] Оценка сопряженности для партий MNC-фидеров, которые не удовлетворяли критериям соответствия

10.3.1. В том случае, когда партия MNC-фидеров удовлетворяла любым критериям соответствия, представленным выше в Разделе 10.2, были проведены нижеследующие стадии для повторного тестирования этой партии на возможное исключение простой ошибки экспериментатора.

10.3.2. Если присутствуют два или более остаточных сосудов для анализа партий сателлитов, то эта партия может быть протестирована повторно. Если отсутствовали два или более остаточных сосудов для анализа партий сателлитов, то эту партию не тестировали в соответствии с критериями соответствия, перечисленными выше в Разделе 10.2.

10.3.3. Два обученных специалиста, включая специалиста, который оценивал рассматриваемую партию, проводили тестирование этой партии одновременно.

10.3.4. Для повторной оценки рассматриваемой партии, стадии 7.2–7.3 повторяли.

10.3.5. Каждый специалист проводил тестирование рассматриваемой партии, а также контрольной партии (как определено выше в Разделе 7.2.4).

10.3.6. Для проведения качественной оценки, рассматриваемую партию и контрольную партию, которые удовлетворяли критериям соответствия, как описано в Разделе 10.2, тестировали для оценки сопряженности, и это тестирование было проведено обоими специалистами.

10.3.7. При удовлетворении этим критериям, эта партия может быть отправлена на рассмотрение в СМО как указано выше в Разделе 10.2.

Пример 7: Процедура количественной оценки отдельных партий гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови

[00397] В этом примере описана новая сокращенная процедура качественной оценки отдельных партий гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС), используемых в качестве аллогенных клеток-фидеров в описанных здесь репрезентативных способах. В этом примере описан протокол оценки партий облученных РВМС для их использования в целях получения клинических партий TIL. Каждая партия облученных РВМС была взята у конкретного донора. При проведении более, чем 100 протоколов

качественной оценки, было обнаружено, что во всех случаях, партии облученных PBMC, взятых из SDBB (Банка крови Сан-Диего), могут стимулировать размножение TIL более, чем в 100 раз на день 7 REP. Такой модифицированный протокол качественной оценки может быть применен и к партиям облученных PBMC донора, взятых из SDBB, которые должны быть протестированы для подтверждения того, что доза гамма-облучения будет достаточной для сообщения этим клеткам некомпетентности по репликации. После того, как было продемонстрировано, что эти клетки сохраняют некомпетентность по репликации в течение 14 дней, партии донорных PBMC рассматривались как прошедшие «качественную оценку» на их использование для продуцирования клинических партий TIL.

[00398] Ключевые термины и определения

мкг - Микрограммы

мкл - микролитры

AIM-V - коммерчески доступная клеточная культуральная среда в камере биологической безопасности

BSC - Кластер дифференцировки

CD - Полная среда для TIL, # 2

CM2 - CM2, в которую добавляли 3000 ME/мл IL-2

CM2IL2 - Организация по заключению промышленных контрактов

CO₂ - Диоксид углерода

EtOH - Этанол

GMP - Стандартная промышленная практика

Gy (Гр) - Грей

IL - Интерлейкин

ME - Международные единицы

LN2 - Жидкий азот

ml - Миллилитр

NA - Отсутствует

OKT3 - Обозначение моноклонального анти-CD3 антитела

P20 - 2-20 мкл-дозатор

P200 - 20-200 мкл-дозатор

PBMC - Мононуклеарные клетки периферической крови

P1000 - 100-1000 мкл-дозатор

PPE - Средства индивидуальной защиты

REP - Протокол быстрого размножения

SDBB - Банк крови Сан-Диего

TIL - Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

T25 - Колба для культивирования ткани 25 см²

$\times g$ – «степень гравитации» – мера относительной центробежной силы.

[00399] Образцы включали облученные РВМС донора (SDBB).

Процедура

Общее описание

7.1.1 Гамма-облученные РВМС, рост которых был прекращен, были необходимы для осуществления стандартного REP TIL. Мембранные рецепторы на РВМС связывались с анти-CD3 антителом (клоном ОКТ3) и перекрестно связывались с TIL в культуре, что стимулировало размножение TIL. Партии РВМС получали после лейкофереза цельной крови, взятой у отдельных доноров. Продукт лейкофереза подвергали центрифугированию на Фиколле-Гипаке, промывали, облучали и подвергали криоконсервации в условиях GMP.

Важно отметить, что пациентам, которые проходили TIL-терапию, не вливали жизнеспособные РВМС, поскольку это может приводить к развитию заболевания «трансплантат против хозяина» (GVHD). Поэтому культивирование донорных РВМС прекращали путем гамма-облучения клеток соответствующей дозой, что приводило к разрыву двухцепочечной ДНК и к потере жизнеспособности РВМС после повторного культивирования.

Критерии оценки

7.2.1. Критерием оценки партии облученных РВМС является их некомпетентность по репликации.

Протокол эксперимента

7.3.1. Партии фидеров тестировали в формате мини-REP, поскольку они были совместно культивированы с TIL в вертикальных колбах для культивирования ткани T25.

7.3.1.1. Контрольная партия: Одна партия облученных РВМС, которая, как уже известно, удовлетворяет критериям 7.2.1, была использована наряду с экспериментальными партиями в качестве контроля.

7.3.2. Для каждой партии тестируемых облученных донорных РВМС брали колбы-дубликаты.

Протокол эксперимента

[00400] Все работы с тканевой культурой, проводимые в соответствии с этим протоколом, были осуществлены стерильным методом в BSC.

День 0

7.4.1. Получали ~90 мл среды CM2 для каждой партии тестируемых донорных РВМС. CM2 хранили в теплом виде на водяной

бане при 37°C.

7.4.2. Аликвоту 6×10^6 МЕ/мл IL-2 оттаивали.

7.4.3. Среду CM2 возвращали в BSC, протирали 70% EtOH и помещали в шкаф. Для каждой тестируемой партии РВМС брали приблизительно 60 мл CM2 и помещали в отдельную стерильную бутылку. IL-2 из оттаянных 6×10^6 МЕ/мл маточного раствора добавляли к этой среде до конечной концентрации 3000 МЕ/мл. Эту бутылку маркировали «CM2/IL2» (или аналогичным образом) для того, чтобы отличить ее от среды CM2 без добавок.

7.4.4. Брали две маркированные колбы T25 для каждой тестируемой партии РВМС. Маркировка включала минимум:

7.4.4.1. Номер партии

7.4.4.2. Номер колбы (1 или 2)

7.4.4.3. Дата начала культивирования (день 0)

Получение ОКТ3

7.4.5. Маточный раствор анти-CD3 антитела (ОКТ3) вынимали из холодильника, 4°C, и помещали в BSC.

7.4.6. Конечная концентрация ОКТ3, используемого в среде мини-REP, составляла 30 нг/мл.

7.4.7. 10 мкг/мл рабочего раствора анти-CD3 антитела (ОКТ3) получали из 1 мг/мл маточного раствора. Этот раствор помещали в холодильник до его использования.

7.4.7.1. Для каждой тестируемой партии РВМС получали 150 мкл маточного раствора анти-CD3 антитела (ОКТ3) с разведением 1:100.

Так, например, для однократного тестирования 4 партий РВМС приготавливали 600 мкл 10 мкг/мл анти-CD3 антитела (ОКТ3) путем добавления 6 мкл из 1 мг/мл маточного раствора к 594 мкл CM2, в которую добавляли 3000 МЕ/мл IL-2.

Подготовка колб

7.4.8. 19 мл на колбу CM2/IL-2 добавляли в маркированные колбы T25, и эти колбы помещали в инкубатор с повышенной влажностью при 37°C и 5% CO₂ для получения клеток.

Получение облученных РВМС

7.4.9. Во избежание перекрестного загрязнения партий, работу с каждой партией донорных РВМС следует проводить отдельно.

7.4.10 Сосуды с тестируемыми партиями РВМС брали после их хранения в LN₂. Эти сосуды хранили при -80°C или держали на сухом льду до оттаивания.

7.4.11. 30 мл CM2 (без добавления IL-2) помещали в конические 50 мл-пробирки для оттаивания каждой партии. Каждую пробирку маркировали с указанием номеров различных партий оттаиваемых РВМС. Пробирки плотно закрывали крышками и помещали на водяную баню при 37°C до использования. При необходимости, конические 50 мл-пробирки возвращали в BSC, протирали 70% EtOH и помещали в шкаф.

7.4.12 Сосуд с РВМС брали из холодильника и помещали на передвижной стенд для пробирок в водяной бане при 37°C для оттаивания. Оттаивание проводили до тех пор, пока в сосуде не оставалось небольшое количество льда.

7.4.13. Оттаянный сосуд опрыскивали или протирали 70% EtOH и переносили в BSC.

7.4.14. С помощью стерильной пипетки для переноса, содержимое сосуда сразу переносили в 30 мл CM2 в коническую 50 мл-пробирку. Из этой пробирки брали приблизительно 1 мл среды для ополаскивания сосуда, а затем, эту промывку возвращали в коническую 50 мл-пробирку. Сосуд плотно закрывали крышкой и слегка встряхивали для промывки клеток.

7.4.15. Центрифугировали при 400× g течение 5 минут при комнатной температуре.

7.4.16. Супернатант отсасывали, и клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл теплой CM2/IL-2 с помощью наконечника 1000 мкл-пипетки. Альтернативно, перед добавлением среды, клеточный осадок ресуспендировали путем передвижения закрытой пробирки по пустому стенду для пробирок. После ресуспендирования клеточного осадка, объем довели до 4 мл с использованием среды CM2/IL-2. Объем регистрировали.

7.4.17. Брали небольшую аликвоту (например, 100 мкл) для подсчета клеток на автоматическом счетчике клеток.

7.4.17.1. Подсчет клеток в дубликате осуществляли на конкретном автоматическом счетчике клеток SOP. Перед подсчетом клеток, часто может оказаться необходимым разведение РВМС. Рекомендуемое начальное разведение составляет 1:10, но оно может варьироваться в зависимости от типа используемого счетчика клеток.

7.4.17.2. Число клеток регистрировали.

7.4.18. Концентрацию РВМС довели до $1,3 \times 10^7$ клеток/мл, как описано в стадии 7.4.15.2, с использованием среды CM2/IL-2. Затем среду тщательно перемешивали путем осторожного

встряхивания или осторожной аспирации вверх и вниз с помощью серологической пипетки.

Подготовка колб для культивирования

7.4.19. Две маркированные колбы T25 брали из инкубатора для культивирования ткани и переносили в BSC.

7.4.20. Сосуд с 10 мкг/мл анти-CD3 антитела/ОКТ3 возвращали в BSC.

7.4.21. 1 мл $1,3 \times 10^7$ клеточной суспензии РВМС добавляли в каждую колбу.

7.4.22. 60 мкл 10 мкг/мл анти-CD3 антитела/ОКТ3 добавляли в каждую колбу.

7.4.23. Закрытые крышками колбы возвращали в инкубаторы для культивирования ткани и, не трогая их, оставляли на 14 дней для роста.

7.4.24. Сосуд с анти-CD3 антителом/ОКТ3 был помещен обратно в холодильник, до тех пор, пока он не потребуется для следующей партии.

7.4.25. Стадии 7.4.9–7.4.24 повторяли для каждой тестируемой партии РВМС.

День 14, Оценка непролиферирующих РВМС

7.4.26. При независимой работе с каждой партией, колбы-дубликаты T25 осторожно возвращали в BSC.

7.4.27. Из каждой колбы с помощью новой серологической 10 мл-пипетки брали ~17 мл, а затем осторожно вынимали остальную среду для измерения объема, оставшегося в колбах. Этот объем регистрировали.

7.4.28. Образец тщательно смешивали путем пипетирования вверх и вниз с использованием той же самой серологической пипетки.

7.4.29. Из каждой колбы брали 200 мкл образца для подсчета клеток.

7.4.30. Клетки подсчитывали на автоматическом счетчике клеток.

7.4.31. Стадии 7.4.26–7.4.31 повторяли для каждой тестируемой партии РВМС.

Результаты и критерии соответствия

Результаты

10.1.1. Доза гамма-облучения были достаточной для сообщения клеткам-фидерам некомпетентности по репликации. Как и ожидалось, все партии удовлетворяли критериям оценки и продемонстрировали

снижение общего числа жизнеспособных клеток-фидеров, оставшихся на 14-й день в культуре REP по сравнению с днем 0.

Критерии соответствия

10.2.1. Каждая протестированная партия облученных донорных РВМС удовлетворяла следующим критериям соответствия.

10.2.2. «Отсутствие роста» означает, что общее число жизнеспособных клеток на день 14 меньше, чем исходное число жизнеспособных клеток при культивировании на день 0 REP.

10.2.3. Если партия не удовлетворяла вышеуказанным критериям, то эту партию снова тестировали в соответствии с протоколом оценки сопряженности, представленным ниже в Разделе 10.4.

10.2.4. После повторного тестирования партии, не удовлетворяющей нужным критериям, любые партии МНС-фидеров, которые не удовлетворяли критериям соответствия при исходной оценке и при оценке сопряженности, исключали.

Оценка сопряженности для партий РВМС, которые не удовлетворяли критериям соответствия

10.4.1. В том случае, когда партия облученных донорных РВМС не удовлетворяла любым критериям соответствия, были проведены нижеследующие стадии для повторного тестирования этой партии на возможное исключение простой ошибки экспериментатора.

10.4.2. Если имеются два или более остаточных сосудов для анализа партий сателлитов, то эта партия может быть протестирована повторно. Если отсутствовали два или более остаточных сосудов для анализа партий сателлитов, то эту партию не тестировали в соответствии с критериями соответствия, перечисленными выше в Разделе 10.2.

10.4.3. По возможности, два обученных специалиста (предпочтительно, включая специалиста, который ранее оценивал рассматриваемую партию) проводили тестирование двух отдельных сосудов независимо. Этот способ является предпочтительным способом оценки сопряженности. Помимо отдельных сосудов с РВМС, обоими специалистами могут быть использованы те же самые реагенты.

10.4.3.1. При отсутствии двух специалистов, тестирование двух сосудов с РВМС для оценки партии, не удовлетворяющей критериям, проводится одним специалистом, причем, работа с каждым сосудом проводится независимо.

10.4.4. Для повторной оценки рассматриваемой партии

повторяли процедуру, описанную в Разделе 7.4 «Протокол эксперимента».

10.4.5. Помимо рассматриваемой партии была протестирована контрольная партия каждым специалистом, проводящим оценку сопряженности.

10.4.5.1. Если оценка сопряженности проводилась двумя специалистами, то оба специалиста независимо тестировали контрольную партию.

10.4.5.2. Если оценку сопряженности проводил только один специалист, то не было необходимости оценивать контрольную партию в дубликате.

10.4.5.3. Для качественной оценки, партия РВМС, прошедшая оценку сопряженности, должна иметь контрольную партию и оба рассматриваемых дубликата для подтверждения, что эти партии удовлетворяют критериям соответствия, как описано в Разделе 10.2.

10.4.5.4. При удовлетворении этим критериям, эта партия может быть отправлена на рассмотрение в СМО как указано выше в Разделе 10.2.

Пример 8: Сравнение TIL до и после криоконсервации

[00401] Смеси антител для образцов и FMO-контроля были приготовлены до начала получения образца и процедуры окрашивания. Смеси хранили при 4°C в темноте в течение периода времени до 60 дней. См. ниже Раздел «Приготовление смеси».

Талица 15: Процедура окрашивания:

Стадия	Описание
1	Аликвоту красителя Aqua брали после хранения в холодильнике в темноте.
2	В каждую пробирку с образцом добавляли 3 мл 1 × PBS
3	Пробирки центрифугировали 5 минут при 300× g
4	Приготавливали краситель Aqua для живых/погибших клеток. Разводили 1:200 в PBS. Для этого потребовалось 25 мкл на образец и контрольная FMO- пробирка. 1:200=мкл Aqua+мл PBS
5	Супернатант в стадии 3 отсасывали или декантировали.
6	В каждую пробирку с образцом добавляли 25 мкл Aqua L/D. Клетки ресуспендировали путем передвижения по стенду. Инкубировали в течение 15 минут, в темноте при комнатной

	температуре.
7	В каждую пробирку добавляли 50 мкл соответствующей смеси Аб без промывки.
8	Пробирки инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре.
9	Добавляли 3 мл промывочного буфера FACS
10	Центрифугировали при 300x g, 5 минут при 4°C.
11	Пробирки ресуспендировали путем передвижения по пустому стенду для пробирок.
12	Добавляли 100 мкл 1% раствора PFA/PBS при 4°C.
13	Образцы хранили при 4°C в темноте в течение периода времени до 72 часов.
14	Образцы оценивали на проточном цитометре.

Таблица 16: Панель дифференцировки 1 (DF1) :

Мишень	Формат	Клон	Поставщик	Номер по каталогу	Титр
TCRab	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	BioLegend	302908	2
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222	3
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033	2
FACS-буфер					33

Таблица 17: Панель дифференцировки 2 (DF2) :

Мишень	Формат	Клон	Поставщик	Номер по каталогу	Титр
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
CCR7*	PE	150503	BD	560765	5

			Biosciences		
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	2
CD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
FACS-буфер					35

* Означает, что должна быть проведена оценка ФМО-контроля (Количество флуоресценции минус фон).

Таблица 18: Панель активации Т-клеток 1 (Tact1)

Мишень	Формат	Клон	Поставщик	Номер по каталогу	Титр
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
Lag3*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD4	FITC	OKT4	BioLegend	317408	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	1
PD1*	APC	EH12.2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
FACS-буфер					34

Таблица 19: Панель активации Т-клеток 2 (Tact2)

Мишень	Формат	Клон	Поставщик	Номер по каталогу	Титр
CD69*	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745	3
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
TIGIT*	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42	3
CD4	FITC	OKT4	BioLegend	317408	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	2
KLRG1*	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
FACS-буфер					34

* Означает, что должна быть проведена оценка ФМО-контроля

(Количество флуоресценции минус фон).

Компенсирующий контроль

1. В 11 пробирок добавляли одну каплю сфер с композицией BD.
2. Маркированные пробирки 1-7 с хромофорами от DF1
3. Маркированные пробирки 8-10 с APCy7, BV421 и Ax647.
4. Пробирка 11 была использована для немеченых сфер.
5. В каждую пробирку добавляли 5 мкл антитела.
6. Инкубировали 10-30 минут в темноте, при комнатной температуре.
7. Промывали 3 мл FACS-буфера
8. Ресуспендировали с 500 мкл 1% PFA.
9. В каждую пробирку добавляли одну каплю сфер, негативных по композиции BD.
10. Хранили при 4°C в темноте. Смесь может быть использована в течение одной недели.

Aqua-контроль:

1. В пробирку с маркировкой Aqua добавляли одну каплю Arc-позитивного контроля.
2. В пробирку добавляли 3 мкл оттаянного раствора Aqua.
3. Стадии 6-10 повторяли как указано выше. Исключение было сделано для Arc-негативной сферы в стадии 9.

Таблица 20: Протокол

Пробирка	Мишень	Формат	Титр
1	TCRab	PE/Cy7	5
2	CD57	PerCP-Cy5.5	5
3	CD28	PE	5
4	CD4	FITC	5
5	CD27	APC-H7	5
6	CD56	APC	5
7	CD8a	PB	5
8	CD3	APC/Cy7	5
9	Tim-3	BV421	5
10	KLRG1	Ax647	5
11	Немеченная	n/a	n/a

Пример 9: Достаточно стабильный фенотип опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов (til) для инфузии после криоконсервации

Краткое описание:

[00402] В этом примере обсуждается разработка способа противораковой иммунотерапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), причем, конечной целью этой разработки является получение терапевтических популяций TIL. Криоконсервация TIL обеспечивает безопасную доставку конечного клеточного продукта в малодоступные области височной доли (Axelsson S, Faresjo M, Hedman M, Ludvigsson J, Casas R: Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children. Cryobiology 2008, 57:201-8).

[00403] В этом примере, свежие и замороженные/оттаянные образцы TIL оценивали на экспрессию отдельных фенотипических маркеров для того, чтобы определить, присутствуют ли в криоконсервированных TIL фенотипические изменения (см., например, Sadeghi A, Ullenhag G, Wagenius G, Tötterman TH, Eriksson F: Rapid expansion of T cells: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery. Acta Oncol. 2013, 52:978-86.)

Результаты:

[00404] Никаких значимых изменений в уровнях экспрессии CD4, CD8, NK, TCR $\alpha\beta$ или маркеров памяти в свежих и оттаянных TIL не наблюдалось. Статус активации TIL, определенный по уровню экспрессии HLA-DR, CD38 и CD69, сохранялся, а регуляторные молекулы LAG-3 и TIM-3 продемонстрировали небольшое снижение уровня экспрессии. Кроме того, жизнеспособность свежего и оттаянного продукта превышала 86%.

Методы:

[00405] PreREP-TIL получали путем культивирования фрагментов опухоли меланомы в присутствии IL-2 (6000 МЕ/мл).

[00406] Протокол быстрого размножения клеток (REP) начинали с использованием облученных аллогенных РВМС-фидеров с ОКТ3 и IL-2 в колбе GREX-100 в течение 11-14 дней.

[00407] Культивированные клетки подвергали криоконсервации в 5% ДМСО.

[00408] Проточный цитометрический анализ свежих и оттаянных TIL в IL-2, проводимый с перерывом на 1-2 часа, осуществляли с использованием четырех панелей, состоящих из оценки линий дифференцировки, дифференцировки, активации и регуляторных маркеров.

Выводы:

[00409] Криоконсервация не влияла на оцененные фенотипические свойства TIL, за исключением небольших изменений для некоторых регуляторных молекул. Авторами была исследована возможность использования криоконсервированных TIL в клинических целях.

Пример 10: Субпопуляции клеток памяти в свежих популяциях и в re-REP-TIL популяциях

[00410] В предыдущих экспериментах, каких-либо субпопуляций центральных клеток памяти в свежих популяциях TIL не наблюдалось (см., фигуру 8). Однако, после ReREP наблюдалось почти 60% центральных клеток памяти, как показано ниже в Таблице 22.

[00411] На основании этих исходных величин было обнаружено, что покоящиеся клетки имели несколько более высокий уровень популяции CD4, чем не покоящиеся клетки. В целом, как и ожидалось, процент CD8 был высоким. Отношение CM (центральных клеток памяти - Q3)/EM (эффекторных клеток памяти - Q4) для CD8 составляло приблизительно 60/40. Интерес представляет экспрессия CD8⁺CD28⁺. Покоящиеся клетки имеют более высокий уровень такой экспрессии. См. также, фигуры 9 и 10A-10B. См. также фигуру 15.

Пример 11: Введение аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) пациентам с меланомой

[00412] Введение аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) пациентам с меланомой давало общий ответ 55% в NCI, 38% в Раковом Центре Мофита, 48% в Раковом Центре Андерсена MD и 40% в Институте рака, г. Шеба, провинция Элла, Израиль. Стабильные ответы, наблюдаемые у пациентов с меланомой с помощью АСТ, открывают возможность для более широкого применения этой технологии для лечения других солидных опухолей. В настоящей заявке была продемонстрирована целесообразность культивирования TIL и разработки TIL-терапии для лечения других солидных опухолей. В этом Примере представлены данные, иллюстрирующие «Успешное размножение и характеризацию опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), происходящих от опухолей, не являющихся меланомой», См., фигуры 12-14.

[00413] Фенотипическая характеристика TIL, происходящих от рака мочевого пузыря, шейки матки и легких, указывала на присутствие более, чем 60-70% CD8⁺-Т-клеток, тогда как TIL, происходящие от рака головы и шеи, продемонстрировали переменное распределение CD8⁺- и CD4⁺-Т-клеток. TIL,

размноженные из TNBC, имели более, чем 80% CD4⁺-Т-клеток. Независимо от опухолей, большинство культур имели менее, чем 20% CD56⁺-NK-клеток.

[00414] TIL были получены путем:

- a. Промывки полученной опухоли в HBSS;
- b. Разрезания опухоли на фрагменты {например, на фрагменты размером 2-3 мм³};
- c. Помещения фрагментов опухоли в колбы для культивирования клеток G-REX 10 со средой, содержащей сыворотку и IL-2;
- d. Замены среды на 7-й день и через каждые 4-5 дней со дня 11 до дня 21; и
- e. Оценки количества, жизнеспособности и фенотипа клеток, с последующей их криоконсервацией и последующего применения, включая, но не ограничиваясь ими, введение пациентам для лечения опухолей, как описано в настоящей заявке.

[00415] Как продемонстрировано в настоящей заявке, TIL культивировали из опухолей, взятых у пациентов с раком легких, мочевого пузыря, головы и шеи, шейки матки и TNBC.

[00416] Кроме того, как показано в настоящей заявке, опухоли легких, мочевого пузыря и шейки матки имеют более высокое количество CD8⁺-TIL. Опухоли головы и шеи и опухоли TNBC имеют, главным образом, CD4⁺-TIL. Кроме того, последующая характеристика CD4⁺ и CD8⁺-TIL продемонстрировала, что эффекторные фенотипические клетки памяти также содержат CD27⁺ и CD28⁺.

[00417] Полное раскрытие и описание, приведенные выше в Примерах, дают среднему специалисту в данной области представление о получении и применении вариантов композиций, систем и способов согласно изобретению, но эти примеры не ограничивают объема настоящего изобретения, заявленного авторами. Модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые являются очевидными для специалистов в данной области, входят в объем нижеследующей формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящей заявке, указывают на уровень техники в области, к которой относится изобретение. Все документы, цитируемые в настоящей заявке, вводятся в настоящее описание посредством ссылки, так, как если бы каждый документ был во всей своей полноте и отдельно введен в настоящее описание посредством ссылки.

[00418] Все заголовки и названия разделов приводятся лишь

для ясности и в иллюстративных целях и не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения. Так, например, специалистам в данной области будет очевидна полезность комбинирования различных аспектов из различных рубрик и разделов в соответствии с существом и объемом описанного здесь изобретения.

[00419] Все цитируемые здесь документы во всей своей полноте и во всех целях вводятся в настоящее описание посредством ссылки так, как если бы каждая отдельная публикация или каждый отдельный патент или патентная заявка были отдельно и конкретно во всей своей полноте и во всех целях введены в настоящее описание посредством ссылки.

[00420] В настоящую заявку может быть введено множество модификаций и вариантов, не выходящих за рамки существа и объема изобретения, как будет очевидно для специалиста в данной области. Конкретно описанные здесь варианты и примеры представлены лишь в иллюстративных целях, причем, настоящее изобретение ограничивается только прилагаемой формулой изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, которые входят в объем формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением терапевтической популяции TIL, включающий:

(i) получение первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ также включает:

(iv) осуществление дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная терапевтическая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

3. Способ по п. 2, в котором после стадии (iii), клетки удаляют из клеточной культуры и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением стадии (iv).

4. Способ по п. 3, в котором клетки оттаивают до проведения стадии (iv).

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадию (iv) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL, в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором

стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней.

7. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней.

9. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором стадии (i)-(iii) или (iv) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетки стадий (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток.

11. Способ по п. 1, в котором антигенпрезентирующими клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

12. Способ по п. 11, в котором PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней от 9 до 17 в стадии (iii).

13. Способ по любому из п.п. 2-12, в котором эффекторныe T-клетки и/или центральные T-клетки памяти в терапевтической популяции TIL в стадии (iv), в отличие от эффекторных T-клеток и/или центральных T-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

14. Способ по п. 13, в котором эффекторные T-клетки и/или центральные T-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

15. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

16. Способ по любому из предшествующих пунктов, также включающий стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный T-клеточный рецептор.

17. Способ по любому из предшествующих пунктов, также включающий стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий

одноцепочечный переменный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей T-клеточный сигнал.

18. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором терапевтическую популяцию TIL вводят пациенту путем инфузии.

19. Способ по п. 1, в котором стадия (iii) также включает стадию удаления клеток из клеточной культуральной среды.

20. Способ по п. 1, в котором стадию (iii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

21. Способ по п. 20, в котором количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

22. Популяция размноженных TIL, полученная способом по п. 1.

23. Популяция размноженных TIL, полученная способом по п. 1, где размноженные TIL обладают по меньшей мере в два раза более сильным базальным гликолизом по сравнению с оттаянными криоконсервированными TIL.

24. Способ оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной способом по п. 1, включающий оценку базального гликолиза клеток.

25. Способ оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной способом по п. 1, включающий оценку базального клеточного дыхания.

26. Способ оценки метаболической активности популяции клеток TIL, полученной способом по п. 1, включающий оценку недостаточной дыхательной способности (SRC) клеток.

27. Способ оценки метаболической активности клеточной популяции TIL, полученной способом по п. 1, включающий оценку гликолитического резерва клеток.

28. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL) с получением терапевтической популяции TIL, включающий:

(i) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, выделенных из опухоли, вырезанной у пациента, в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL; и

(ii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL

дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (АРС) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL.

29. Способ по п. 28, отличающийся тем, что способ также включает:

(iii) осуществление дополнительного второго размножения третьей популяции TIL путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и АРС, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (ii), где более крупная терапевтическая популяция TIL имеет увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

30. Способ по п. 29, в котором клетки клеточной культуральной среды стадии (ii) удаляют и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением стадии (iii).

31. Способ по п. 30, в котором клетки оттаивают перед проведением стадии (iii).

32. Способ по п. 28, в котором стадию (ii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

33. Способ по п. 32, в котором количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

34. Способ по любому из п.п. 28-33, где АРС представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

35. Способ по любому из п.п. 29-34, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами,

выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

36. Способ по п. 35, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

37. Способ лечения индивидуума с раком, включающий введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), который включает:

(i) получение первой популяции TIL из опухоли, вырезанной у пациента;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и

(iv) введение пациенту терапевтически эффективной дозы третьей популяции TIL.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что способ, перед проведением стадии (iv), также включает проведение стадии дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (iii), где более крупная терапевтическая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

39. Способ по п. 37, в котором после стадии (ii), клетки удаляют из клеточной культуральной среды и подвергают

криоконсервации в среде для хранения перед проведением дополнительного второго размножения по п.38.

40. Способ по п. 39, в котором перед проведением дополнительного второго размножения по п.38, клетки оттаивают.

41. Способ по п. 37, в котором стадию (iii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

42. Способ по п. 41, в котором количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

43. Способ по любому из п.п. 37-42, в котором APC представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

44. Способ по любому из п.п. 37-43, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

45. Способ по п. 44, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

46. Способ по любому из п.п. 37-45, в котором рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы, негативного по трем признакам, и немелкоклеточной карциномы легких.

47. Способ лечения индивидуума с раком, включающий введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL), включающий:

(i) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, взятых из опухоли, вырезанной у пациента, в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(ii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих

клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 100 раз превышает вторую популяцию TIL, и где второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением третьей популяции TIL, где третьей популяцией TIL является терапевтическая популяция TIL, которая включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению со второй популяцией TIL; и

(iii) введение пациенту терапевтически эффективной дозы терапевтической популяции TIL.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что способ, перед проведением стадии (iii), также включает проведение стадии дополнительного второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC, где дополнительное второе размножение осуществляют по меньшей мере в течение 14 дней с получением более крупной терапевтической популяции TIL, чем популяция, полученная в стадии (ii), где более крупная терапевтическая популяция TIL включает увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по сравнению с третьей популяцией TIL.

49. Способ по п. 47, в котором после стадии (ii), клетки удаляют из клеточной культуральной среды и подвергают криоконсервации в среде для хранения перед проведением дополнительного второго размножения по п. 48.

50. Способ по п. 49, в котором перед проведением дополнительного второго размножения по п. 48, клетки оттаивают.

51. Способ по п. 47, в котором стадию (ii) повторяют от одного до четырех раз в целях получения TIL в терапевтической популяции TIL в количестве, достаточном для приготовления терапевтически эффективной дозы TIL.

52. Способ по п. 51, в котором количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

53. Способ по любому из п.п. 47-52, в котором APC представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (PBMC).

54. Способ по любому из п.п. 47-53, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, в отличие от эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в третьей

популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

55. Способ по п. 54, в котором эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

56. Способ по любому из п.п. 47-55, в котором рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы, негативного по трем признакам, и немелкоклеточной карциномы легких.

57. Способ анализа TIL, включающий:

(i) получение первой популяции TIL;

(ii) осуществление первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, с получением второй популяции TIL;

(iii) осуществление второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду для второй популяции TIL дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующих клеток (APC) с получением третьей популяции TIL, где третья популяция TIL по меньшей мере в 50 раз превышает вторую популяцию TIL;

(iv) сбор, промывку и криоконсервацию третьей популяции TIL;

(v) хранение криоконсервированных TIL при криогенной температуре;

(vi) оттаивание третьей популяции TIL с получением оттаянной третьей популяции TIL; и

(vii) осуществление дополнительного второго размножения части оттаянной третьей популяции TIL путем добавления в клеточную культуральную среду для третьей популяции дополнительного количества IL-2, ОКТ-3 и APC для reREP в течение по меньшей мере 3 дней, где третье размножение проводят для получения четвертой популяции TIL, где число TIL в четвертой популяции TIL сравнивают с числом TIL в третьей популяции TIL с получением отношения;

(viii) определение, исходя из отношения в стадии (vii), может ли оттаянная популяция TIL быть подходящей для введения

пациенту;

(ix) введение терапевтически эффективной дозы оттаянной третьей популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL превышает 5:1 в стадии (viii).

58. Способ по п. 57, в котором осуществление reREP продолжают до тех пор, пока отношение числа TIL в четвертой популяции TIL к числу TIL в третьей популяции TIL не превышало 50:1.

59. Способ по п. 57, в котором количество TIL, достаточное для приготовления терапевтически эффективной дозы, составляет приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$.

60. Способ по любому из п.п. 57-59, в котором стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 40 дней до приблизительно 50 дней.

61. Способ по любому из п.п. 57-59, в котором стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 48 дней.

62. Способ по любому из п.п. 57-59, в котором стадии (i)-(vii) осуществляют в течение периода времени приблизительно от 42 дней до приблизительно 45 дней.

63. Способ по любому из п.п. 57-59, в котором стадии (i)-(vii) осуществляют в течение приблизительно 44 дней.

64. Способ по любому из п.п. 57-63, в котором клетки стадий (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровне, аналогичном уровню для свежесобранных клеток.

65. Способ по п. 57, в котором антигенпрезентирующими клетками являются мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC).

66. Способ по любому из п.п. 6-45, в котором PBMC добавляют в клеточную культуру в любой из дней 9-17 в стадии (iii).

67. Способ по любому из п.п. 57-66, в котором эффекторныe T-клетки и/или центральные T-клетки памяти в более крупной популяции TIL в стадии (iii) или (vii), в отличие от эффекторных T-клеток и/или центральных T-клеток памяти в третьей популяции клеток, обладают одним или более свойствами, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, увеличения длины теломер, повышения уровня экспрессии CD57 и снижения уровня экспрессии CD56.

68. Способ по п. 67, в котором эффекторныe T-клетки и/или

центральные Т-клетки памяти имеют повышенный уровень экспрессии CD57 и пониженный уровень экспрессии CD56.

69. Способ по любому из п.п. 57-68, в котором APC представляют собой искусственные APC (aAPC).

70. Способ по любому из п.п. 57-69, также включающий стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

71. Способ по п. 70, в котором стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

72. Способ по любому из п.п. 57-71, также включающий стадию трансдукции первой популяции TIL экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), включающий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, связанный по меньшей мере с одним эндодоменом молекулы, передающей Т-клеточный сигнал.

73. Способ по п. 72, в котором стадию трансдукции осуществляют перед стадией (i).

74. Способ по любому из п.п. 57-75, в котором TIL анализируют на жизнеспособность после стадии (vii).

75. Способ анализа TIL, включающий:

(i) получение части первой популяции криоконсервированных TIL;

(ii) оттаивание части первой популяции криоконсервированных TIL;

(iii) осуществление первого размножения путем культивирования части первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (APC) для проведения reREP по меньшей мере в течение 3 дней с получением второй популяции TIL, где часть первой популяции TIL сравнивают со второй популяцией TIL и получают отношение числа TIL, где отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 5:1;

(iv) определение, исходя из отношения в стадии (iii), может ли первая популяция TIL быть подходящей для ее использования в целях терапевтического введения пациенту; и

(v) терапевтическое введение остальной части первой популяции TIL пациенту, если отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в первой популяции TIL превышает 5:1 в

стадии (iv).

76. Способ по п. 75, в котором отношение числа TIL во второй популяции TIL к числу TIL в части первой популяции TIL превышает 50:1.

77. Способ по п.п. 75 или 76, также включающий осуществление размножения всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i) способами по любому из предшествующих пунктов.

78. Способ по п.п. 75 или 76, также включающий введение пациенту всей первой популяции криоконсервированных TIL в стадии (i).

79. Способ по п.п. 75-77, также включающий стадию оценки метаболического дыхания второй популяции TIL.

80. Способ по п.п. 75-78, также включающий стадию оценки фенотипа второй популяции TIL.

81. Способ по п.п. 75-79, в котором антигенпрезентирующими клетками являются аллогенные моноклеарные клетки периферической крови.

По доверенности

ФИГ. 1

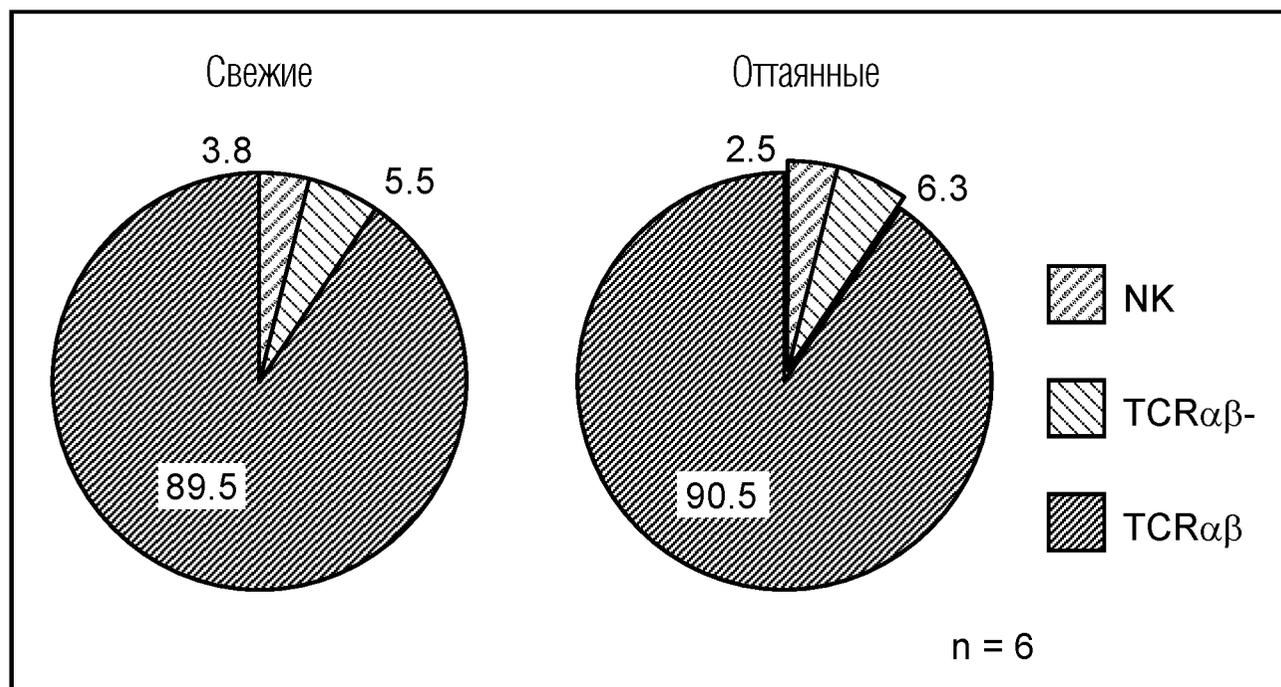
Таблица 1

Тип опухоли		Свежие продукт	Криоконсервированный продукт	
		После сбора	После оттаивания	После рестимуляции
Злокачественная меланома (M1053T) REP	<u>Оx Phos (пмоль/мин)</u>			
	Базальное дыхание	17.5 ± 4.4	9.5 ± 4.9	22.5 ± 2.5
	SRC	19.3 ± 9.0	27.5 ± 12.1	16.8 ± 2.6
	SRC (% от базального уровня)	210.6 ± 51.4	389.8 ± 127.4	174.7 ± 11.3
	<u>Гликолиз (мрН/мин)</u>			
	Базальный гликолиз	31.1 ± 4.4	22.5 ± 1.2	103.1 ± 5.4
	Гликолитический резерв	26.4 ± 5.5	20.7 ± 2.2	15.9 ± 7.7
Гликолитический Res (% от базального уровня)	185.1 ± 17.6	192.0 ± 9.9	115.5 ± 7.4	

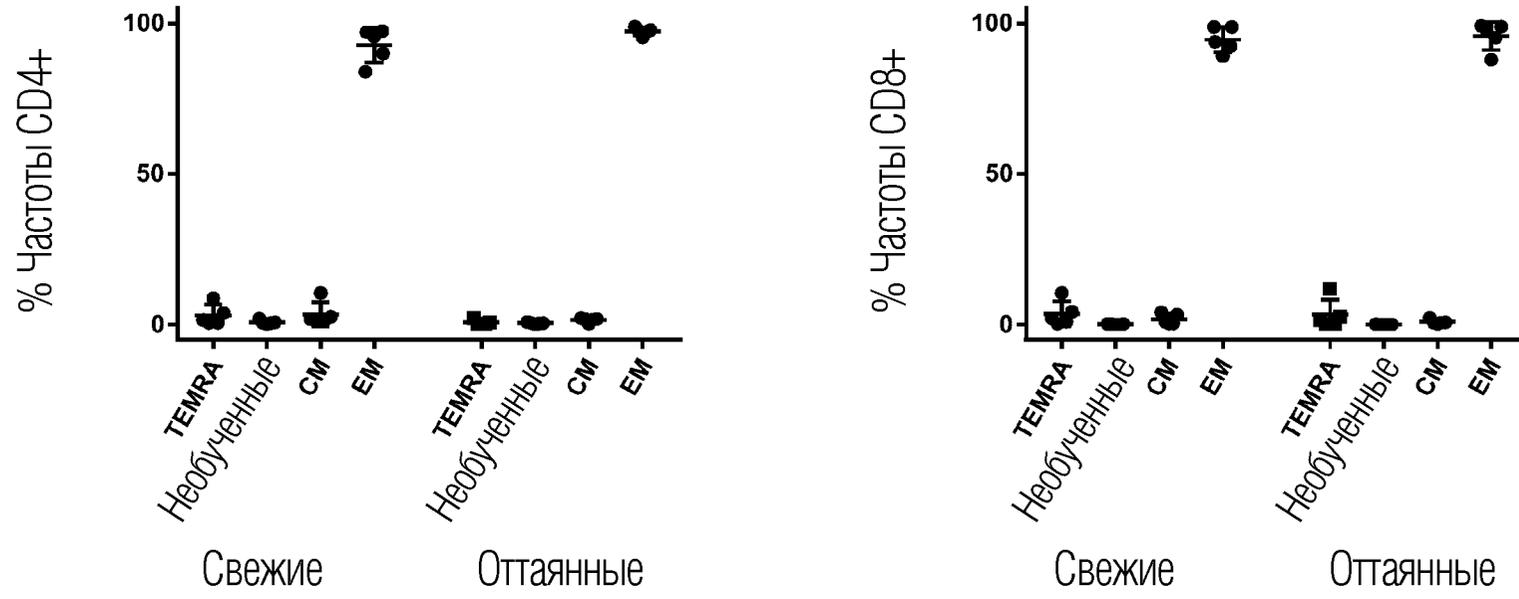
1/17

556341

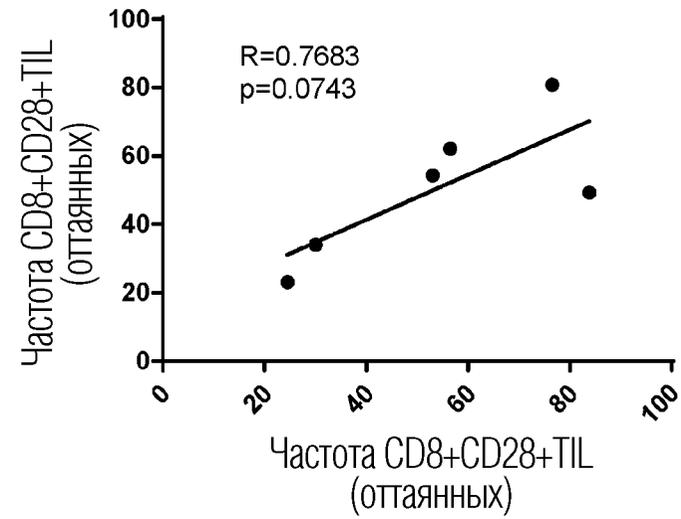
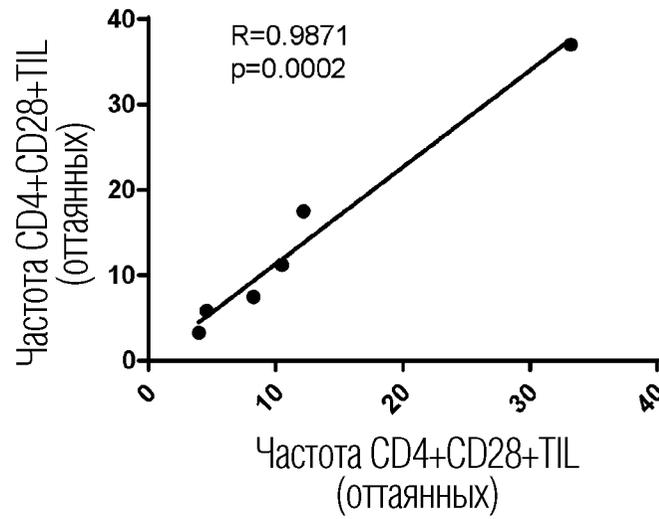
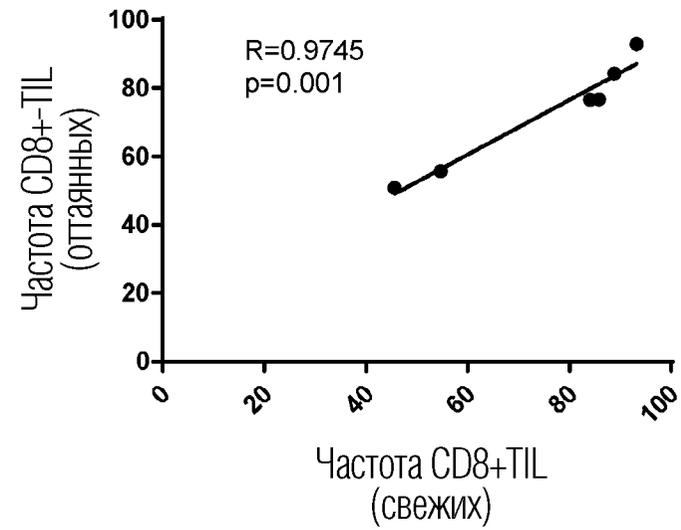
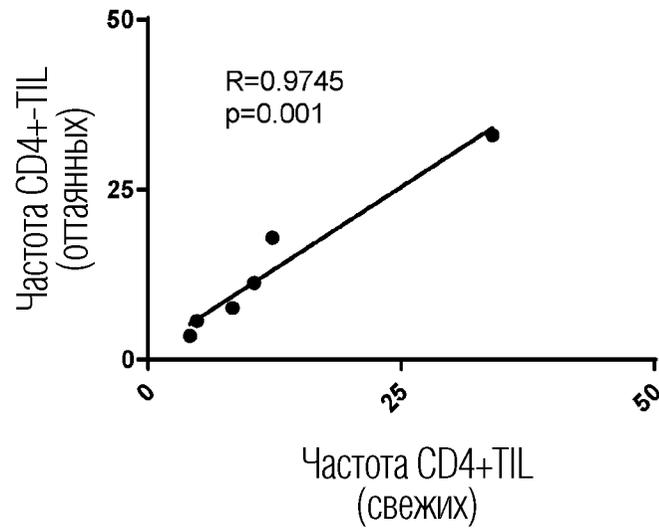
ФИГ. 2



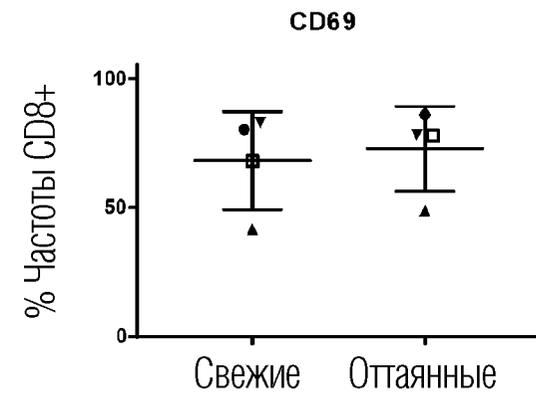
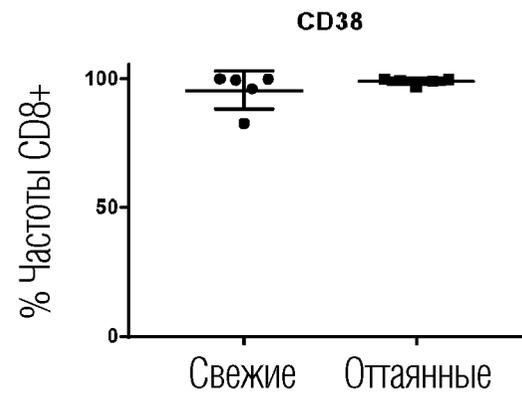
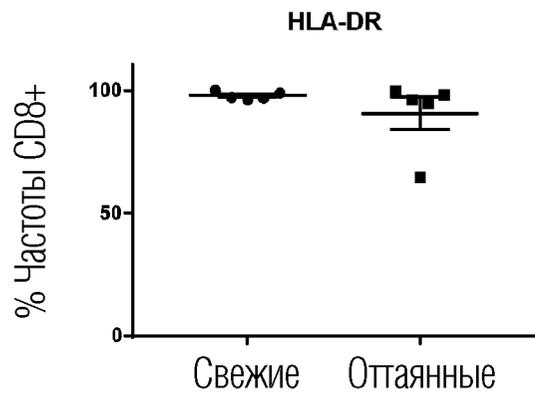
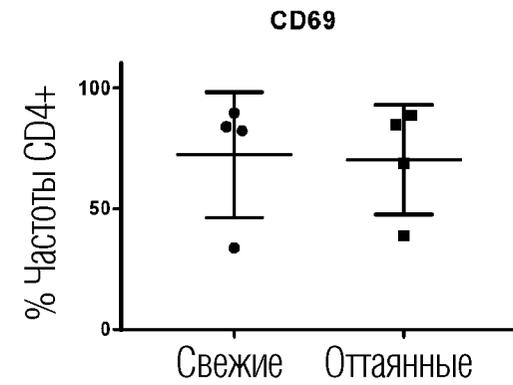
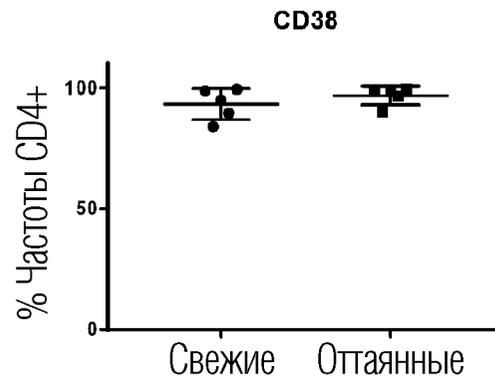
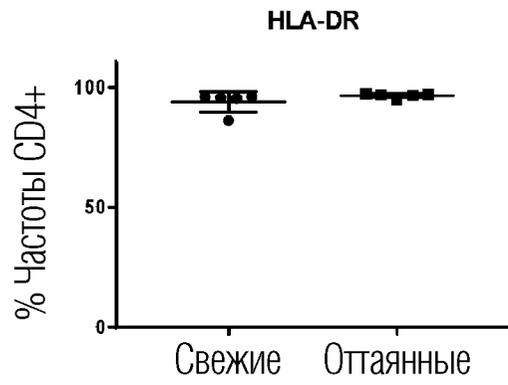
ФИГ. 3



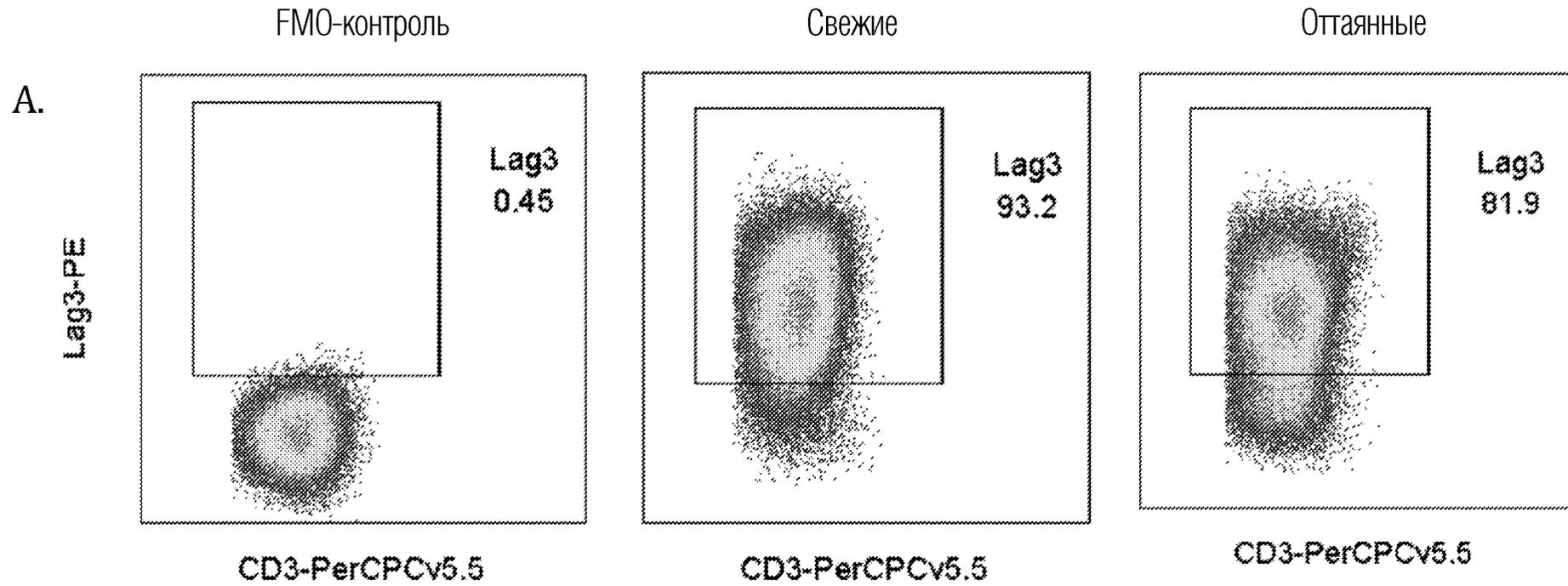
ФИГ. 4



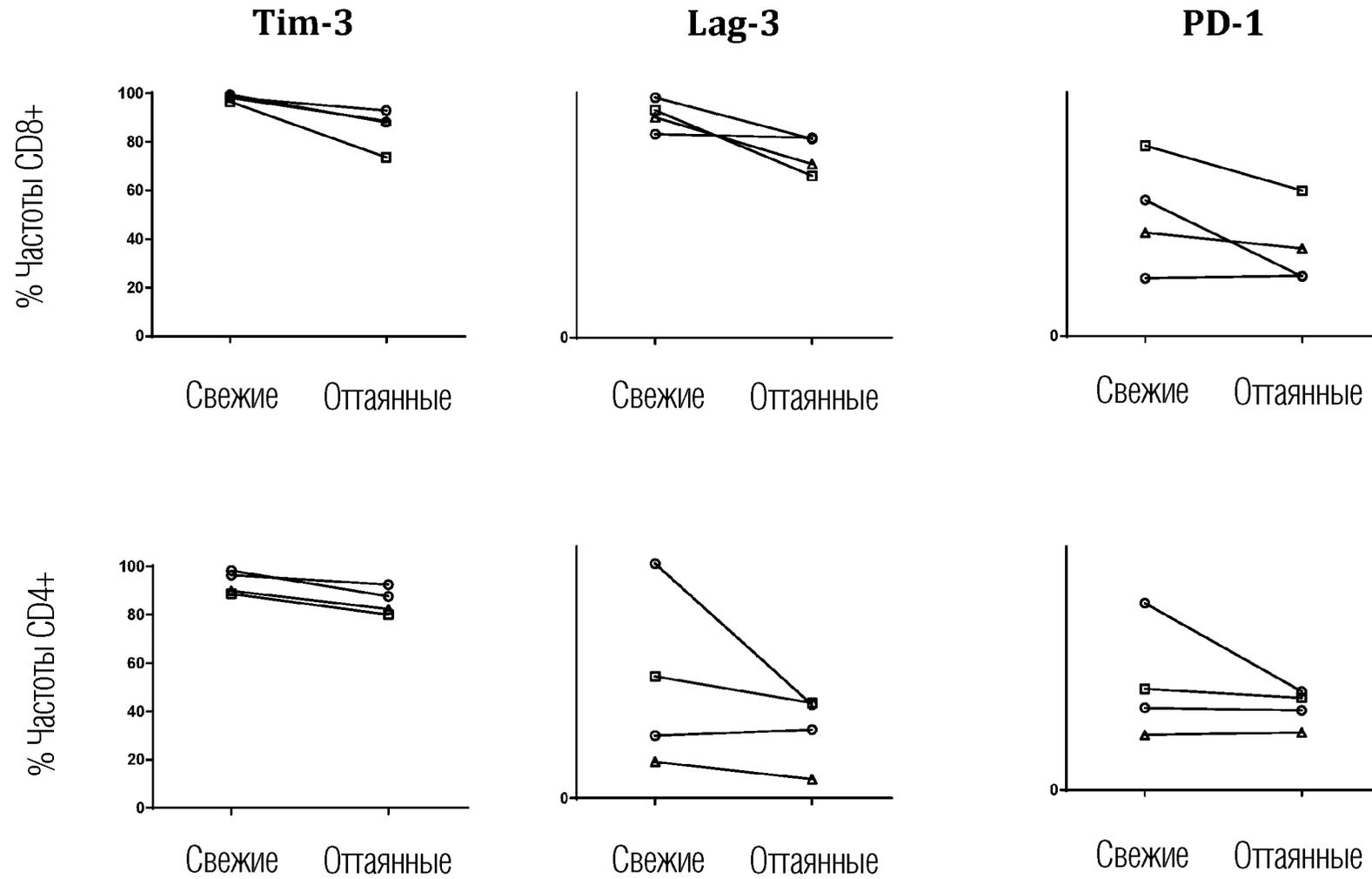
ФИГ. 5



ФИГ. 6А



ФИГ. 6В



ФИГ. 7



В ВЫСОКОЙ СТЕПЕНИ СТАБИЛЬНЫЙ ФЕНОТИП ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ (TIL) ДЛЯ ИНФУЗИИ ПОСЛЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ.

Ian Frank, Amanda Stramer, Michelle Blaskovich, Jyothi Sethuraman, Seth Wardell, Maria Fardis, Jim Bender, Anand Veerapathran, Michael T. Lotze Lion Biotechnologies, Inc.

Краткое описание: Специалисты компании Lion Biotechnologies обсуждают разработку и коммерциализацию противораковой иммунотерапии на основе опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (TIL). Криоконсервация TIL обеспечивает безопасную доставку конечного клеточного продукта в малодоступные области височной доли¹. Клинические использования с использованием криоконсервированных TIL до сих пор не проводились. Замораживание и оттаивание рецепторов клеточной поверхности². В своих исследованиях, авторы протестировали свежие и замороженные/оттаянные образцы TIL и оценивали экспрессию отдельных фенотипических маркеров.

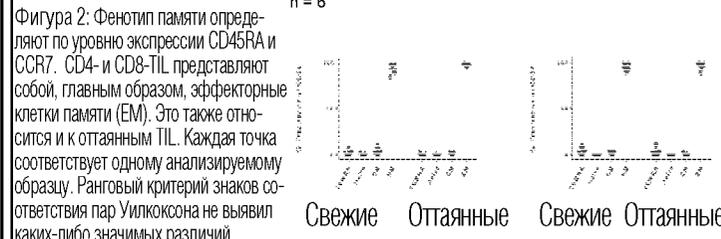
Результаты: Никаких значимых различий в уровнях экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ или маркеров памяти в свежих и оттаянных TIL не наблюдалось. Статус активации TIL, определенный по уровню экспрессии HLA-DR, CD38 и CD69, сохранялся, а регуляторные молекулы LAG-3 и TIM-3 продемонстрировали небольшое снижение уровня экспрессии. Кроме того, жизнеспособность свежего и оттаянного продукта превышала 86%.

Методы:

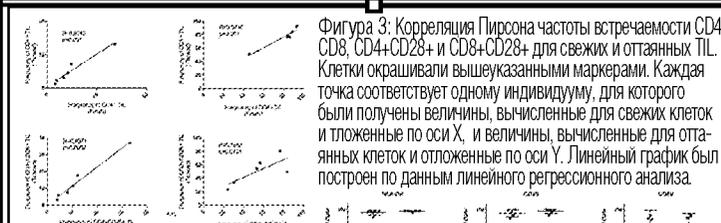
- PreREP-TIL получали путем культивирования фрагментов опухоли меланомы в присутствии IL-2 (6000 МЕ/мл).
- Протокол быстрого размножения клеток (REP) начинали с использованием облученных аллогенных МКПК-фибродов с OKT3 и IL-2 в колбе GREX-100 в течение 11-14 дней.
- Культивированные клетки подвергали криоконсервации в 5% ДМСО.
- Проточный цитометрический анализ, проводимый с перерывом на 1-2 часа, в присутствии IL-2, осуществляли с использованием четырех панелей, состоящих из оценки линий дифференцировки, дифференцировки, активации и регуляторных маркеров



Фигура 1: Состав свежих и оттаянных TIL. TIL окрашивали на TCRαβ и CD56 для определения популяций T-клеток и NK. Данные представлены как среднее для 6 отдельных TIL



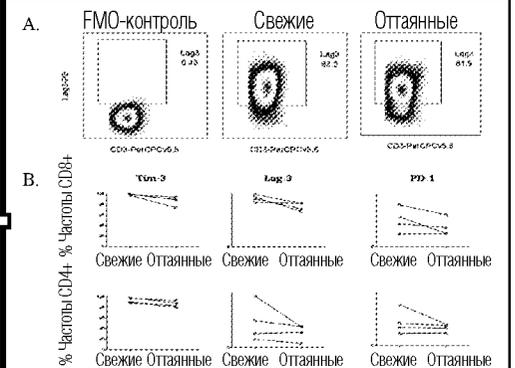
Фигура 2: Фенотип памяти определяют по уровню экспрессии CD45RA и CCR7. CD4+ и CD8-TIL представляют собой, главным образом, эффекторные клетки памяти (EM). Это также относится к оттаянным TIL. Каждая точка соответствует одному анализируемому образцу. Ранговый критерий знаков соответствия пар Уилкоксона не выявил каких-либо значимых различий



Фигура 3: Корреляция Пирсона частоты встречаемости CD4, CD8, CD4+CD28+ и CD8+CD28+ для свежих и оттаянных TIL. Клетки окрашивали вышеуказанными маркерами. Каждая точка соответствует одному индивидууму, для которого были получены величины, вычисленные для свежих клеток и сложенные по оси X, и величины, вычисленные для оттаянных клеток и отложенные по оси Y. Линейный график был построен по данным линейного регрессионного анализа.



Фигура 4: Сравнительные маркеры активации для свежих и оттаянных TIL. Ранговый критерий соответствия пар Уилкоксона не выявил каких-либо значимых различий в статусе активации свежих и оттаянных TIL. Каждая точка соответствует одному анализируемому образцу и представлена как среднее ± ср. кв.ош



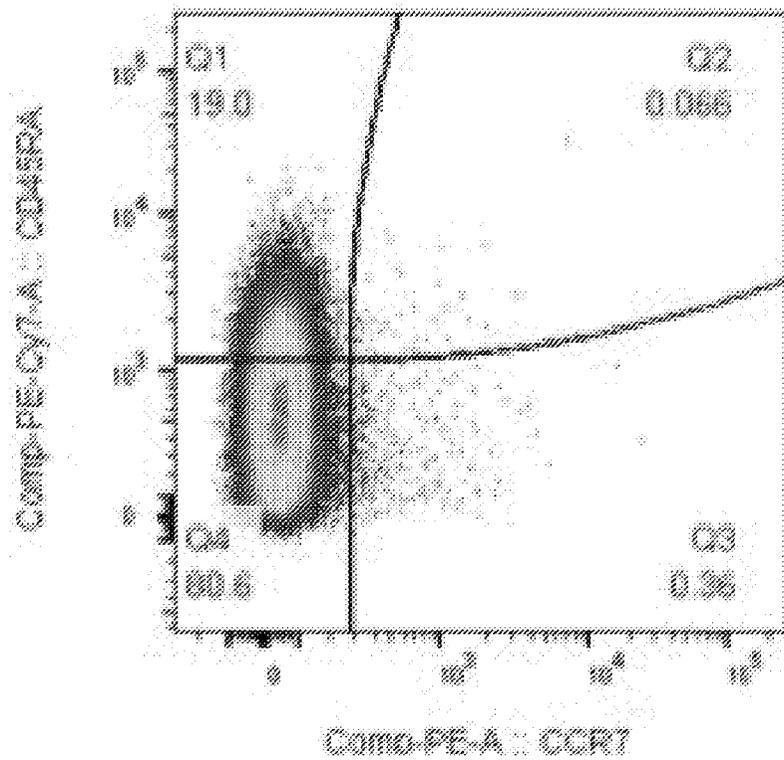
Фигура 5: Сохранение LAG-3-окраски после криоконсервации и оттаивания. A: LAG-3-окрашивание CD8 TIL. B: % Частоты регуляторных молекул популяций CD4 и CD8 на свежих и оттаянных TIL. % Оттаянных CD8+TIM-3+ и оттаянных CD8+LAG-3+TIL был ниже, чем процент свежих TIL. Статистический критерий Манна-Уитни.

Заключение. Криоконсервация не влияла на измеренные фенотипические характеристики TIL, за исключением незначительных изменений в некоторых регуляторных молекулах. Мы изучаем возможность использования криоконсервированной TIL в клинических условиях.

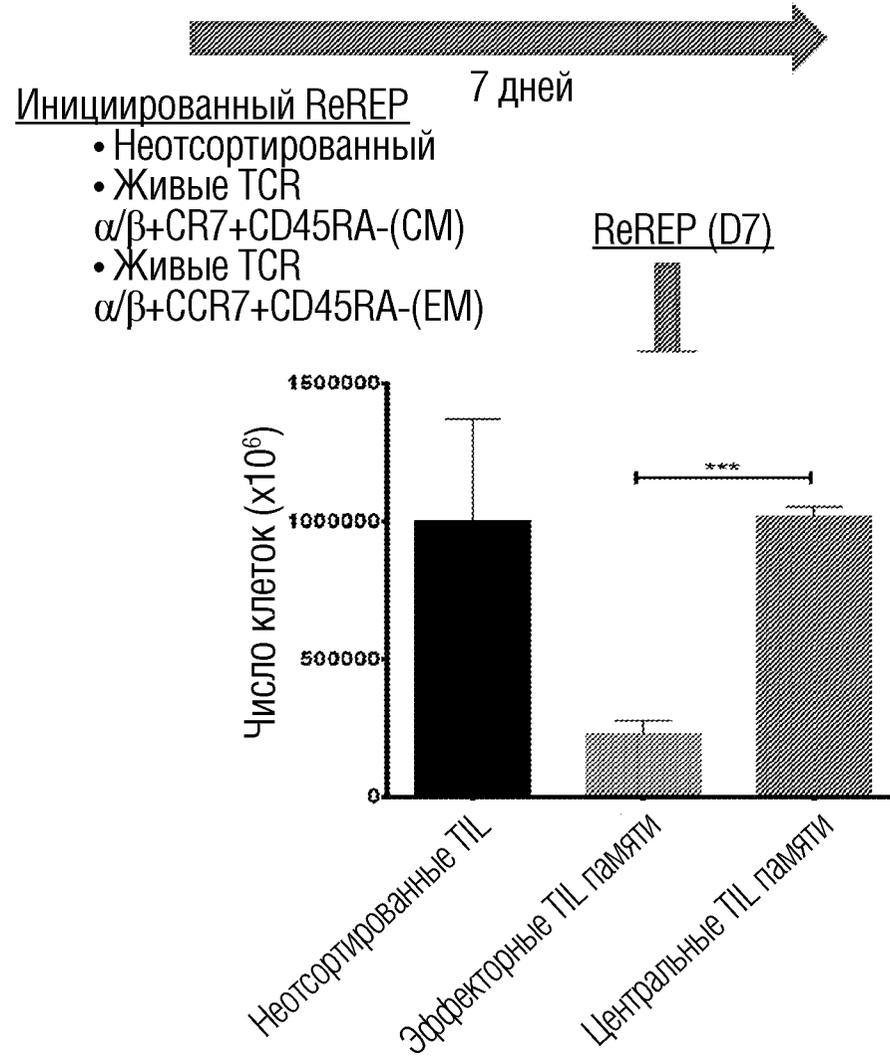
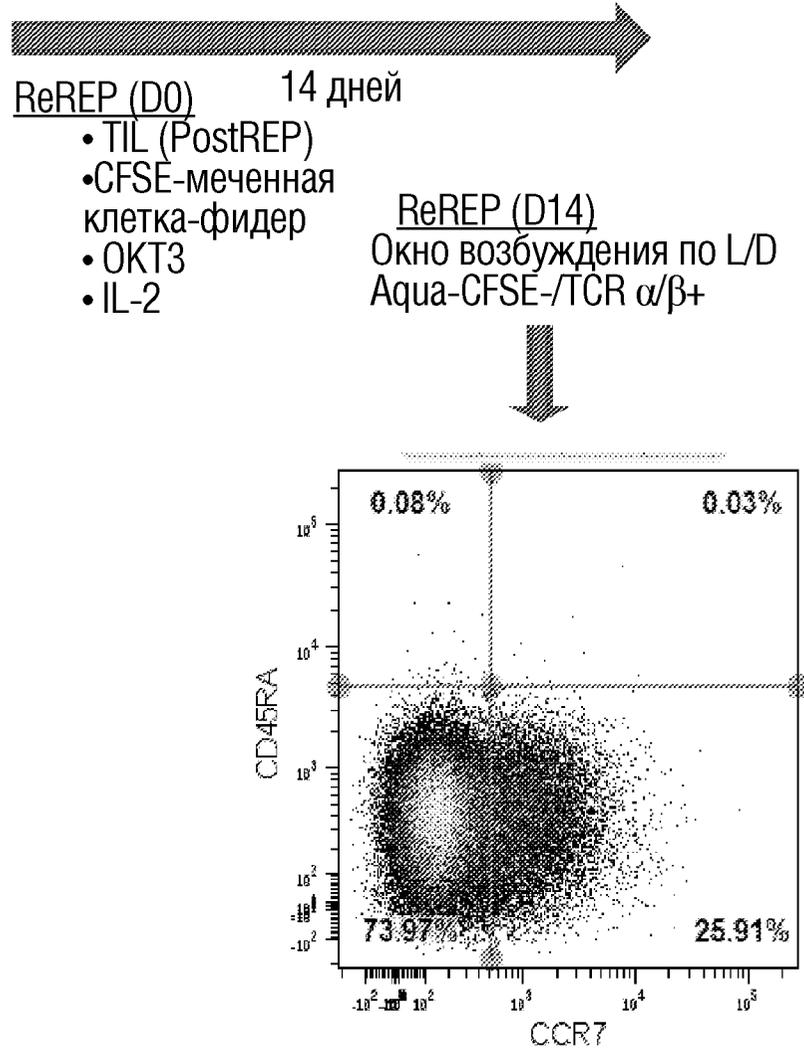
References

1. Axelsson S, Faresjo M, Hedman M, Ludvigsson J, Casa R: Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children, *Cryobiology* 2008, 57:201-8
2. Sadeghi A, Ullenhag G, Wagenius G, Totterman TH, Eriksson F: Rapid expansion of T cell: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery. *Acta Oncol.* 2013,52:978-86.

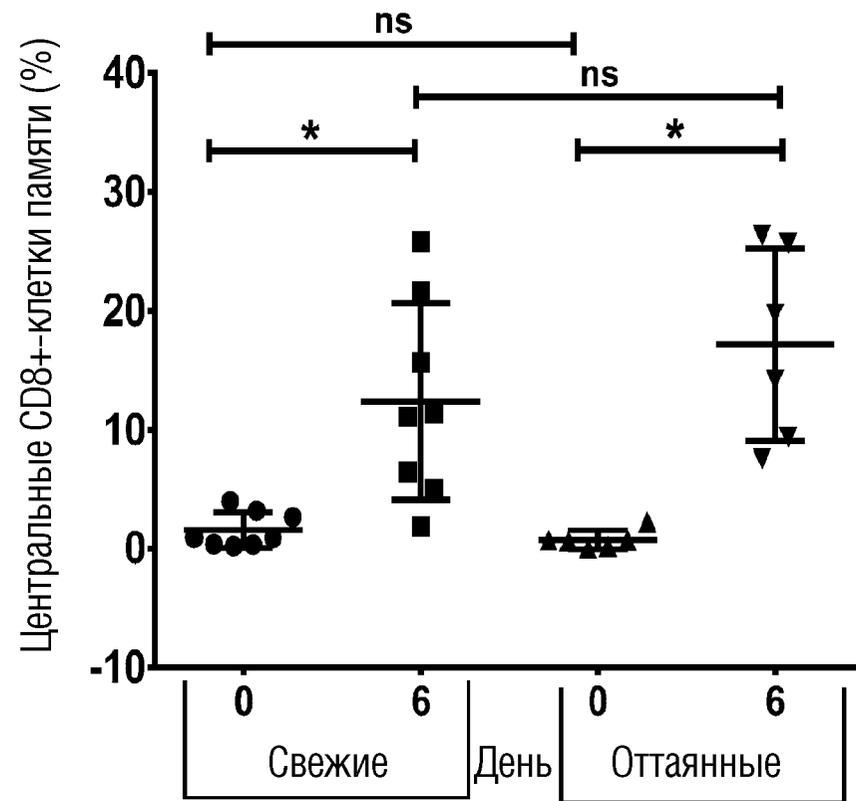
ФИГ. 8



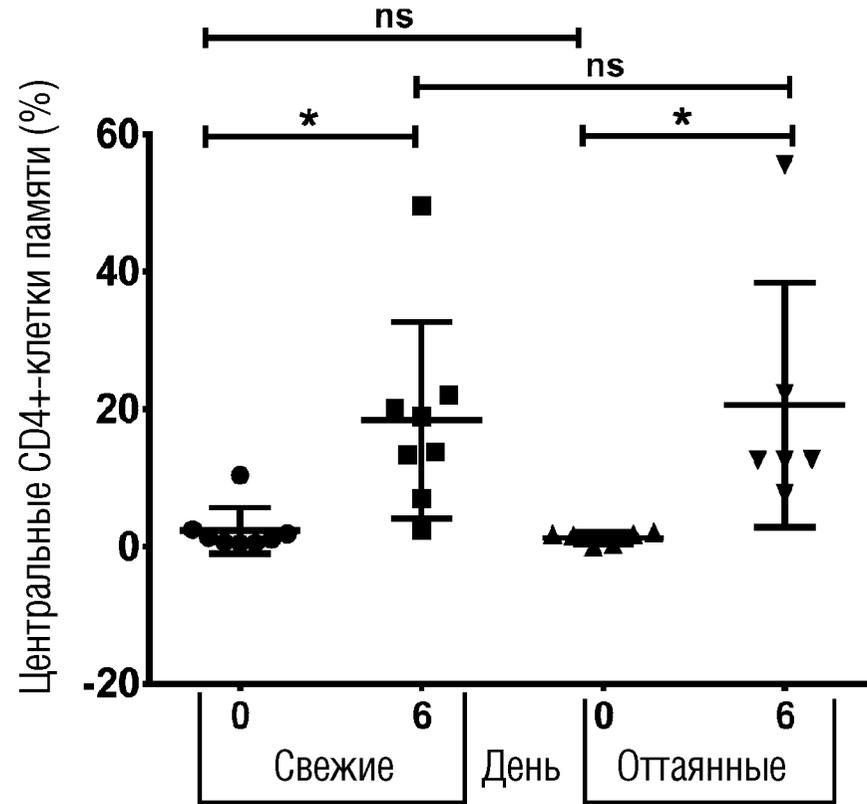
ФИГ. 9



ФИГ. 10А



ФИГ. 10В



ФИГ. 11

Способ 1С: Дни 43-55 для стадий А-Е

1. СТАДИЯ А

Взятие образца опухоли у пациента

2. СТАДИЯ В

Фрагментация и первое размножение
на дни 11-21

3. СТАДИЯ С

Переход от первого размножения ко второму размножению
Необязательное хранение до отбора

4. СТАДИЯ D

Второе размножение
IL-2, ОКТ-3, антигенпрезентирующие клетки-фидеры
Необязательное повторение один или более раз

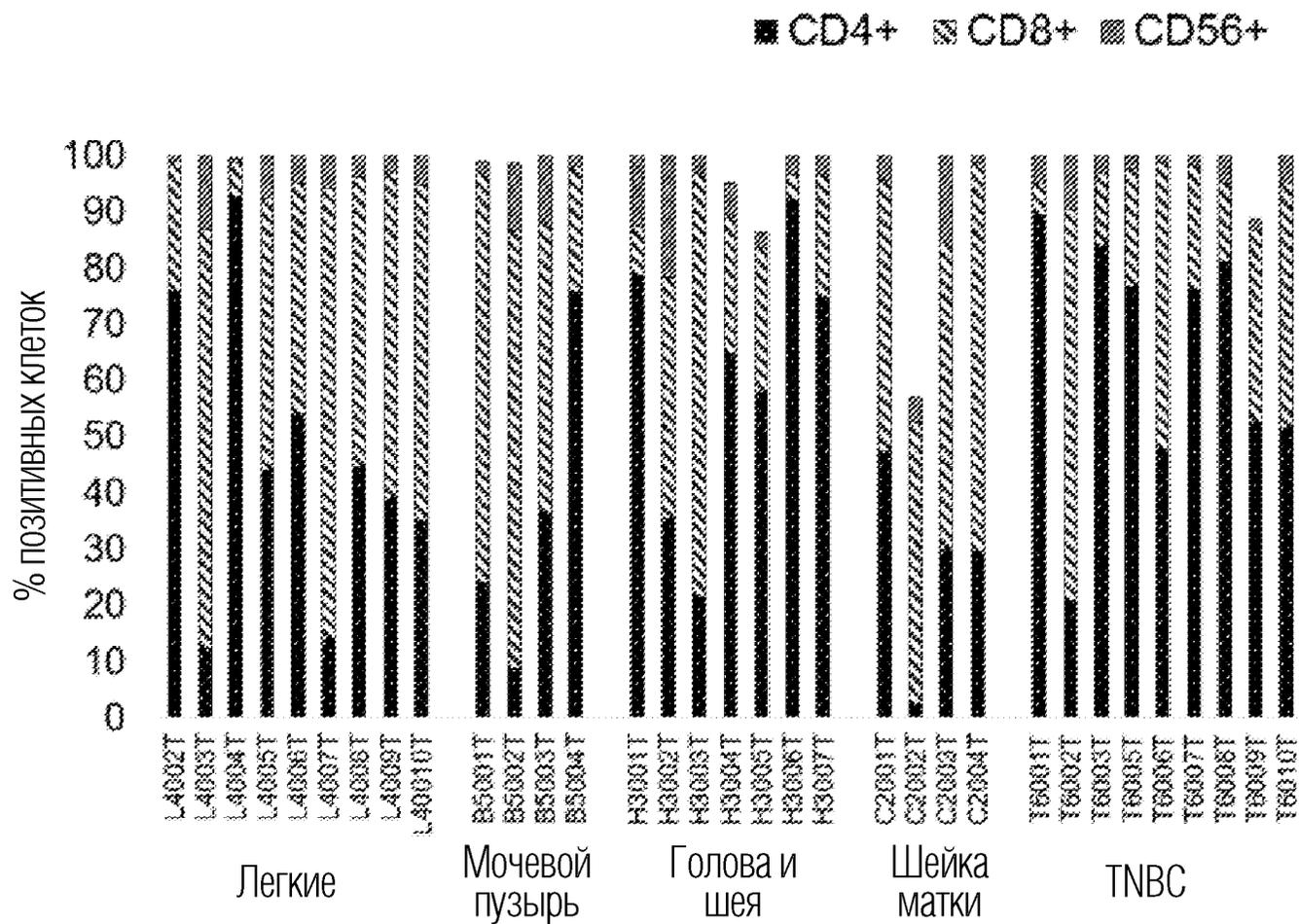
5. СТАДИЯ Е

Сбор TIL, полученных в Стадии D

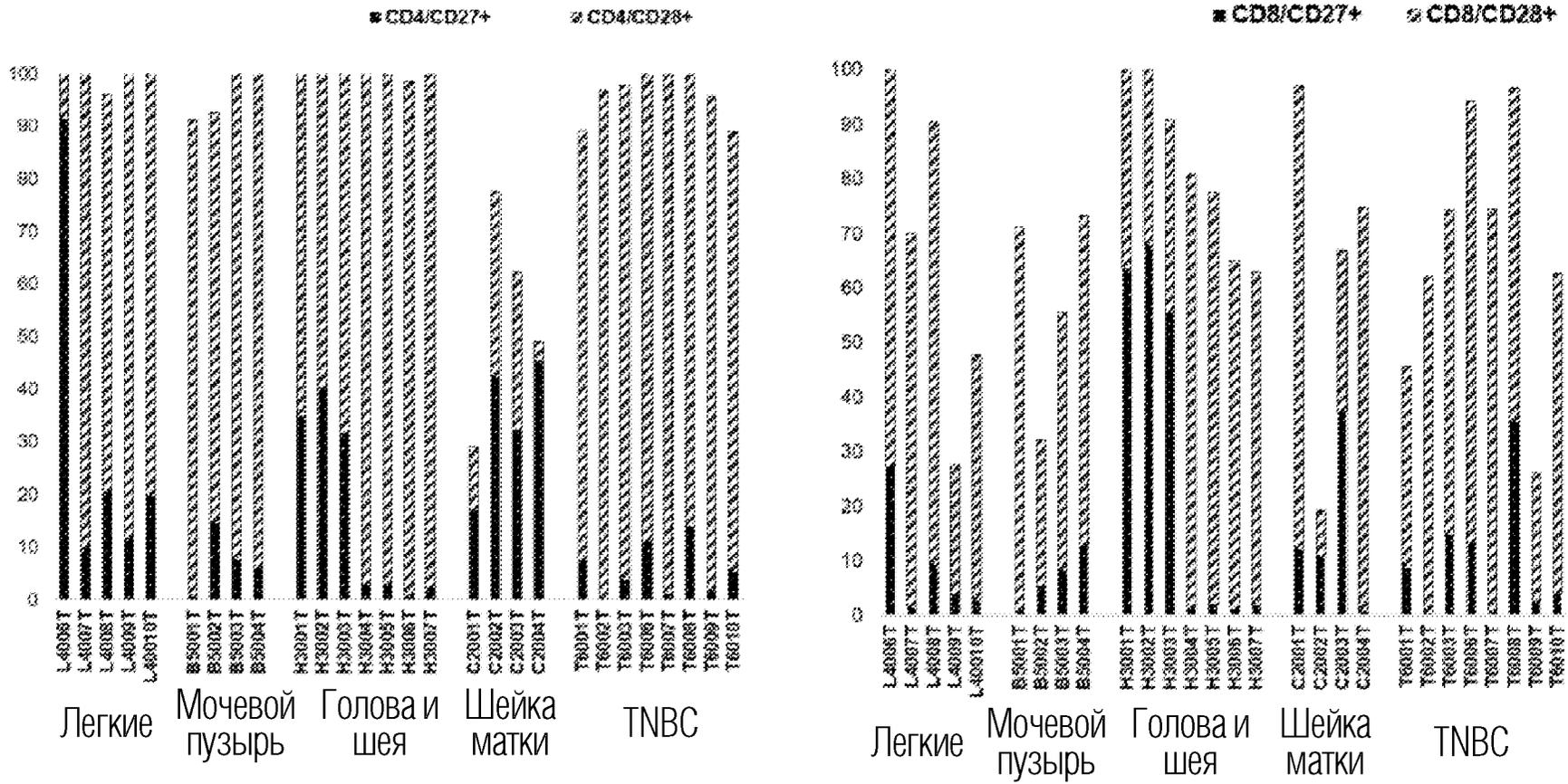
6. СТАДИЯ F

Получение конечного препарата и/или перенос в
пакет для инфузии

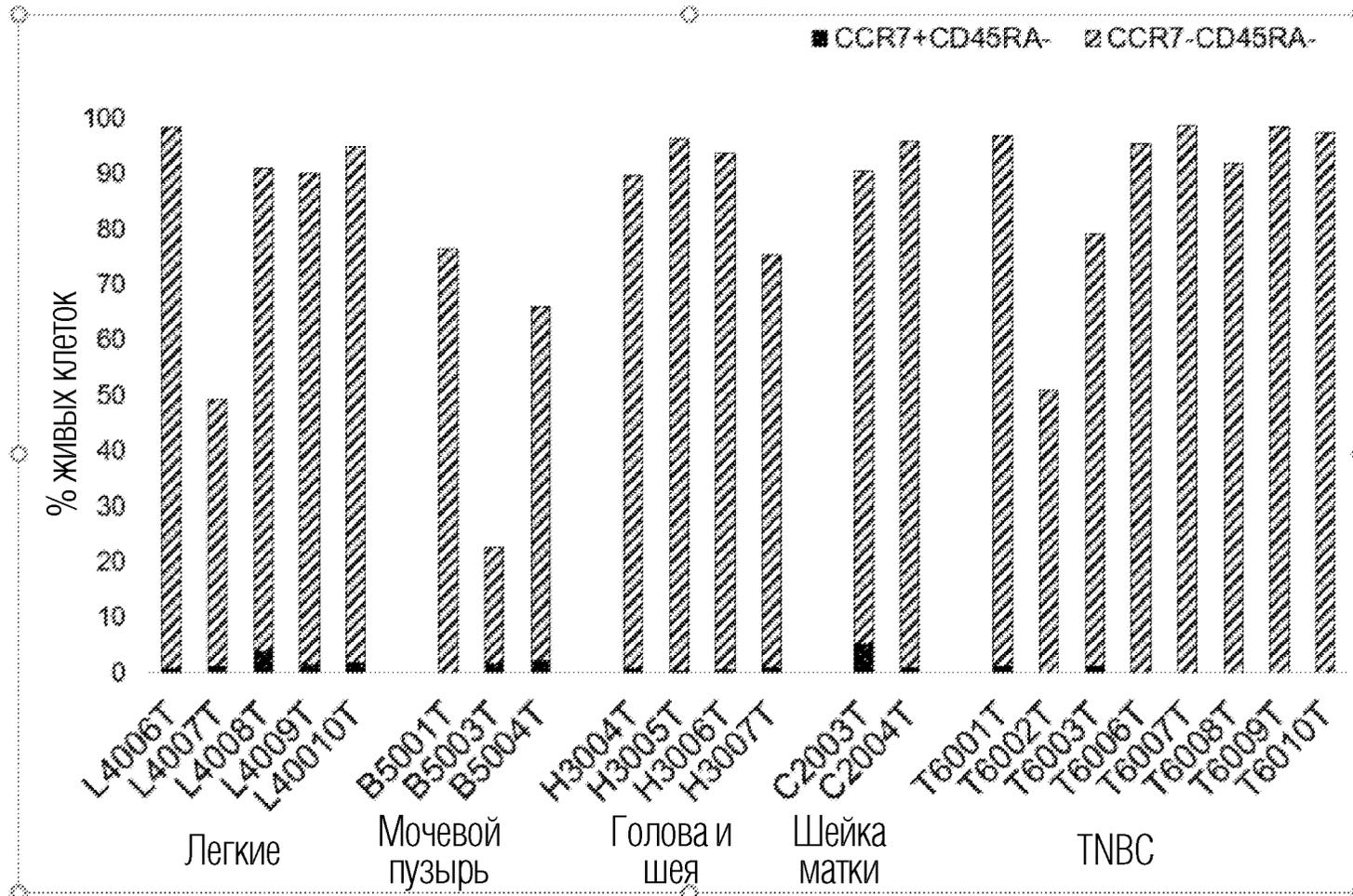
ФИГ. 12



ФИГ. 13



ФИГ. 14



ФИГ. 15

НАЗВАНИЕ ПРОБИРКИ	SSRC	Отобран- ные/ живые	Отобран- ные/ живые	Отобранные/ живые CD8	Отобранные/ живые CD8	Отобран- ные/живые CD8	Отобран- ные/живые CD8	Отобран- ные/живые CD8	Отобран- ные/живые CD8	Отобран- ные/живые CD8	Отобранные/ живые CD8							
		CD4	CD8	Q1: CCR7-, CD45RA+	Q2: CCR7+, CD45RA+	Q3: CCR7+, CD45RA-	Q4: CCR7-, CD45RA-	Q5: CD28-, CD57+	Q6: CD28+, CD57+	Q7: CD28+, CD57-	Q8: CD28-, CD57-	Наследуе- мость						
1.00E+08	Не поко- ящиеся	3.01	95	0.53	0.53	52	46.9	2.16	0.23	7.87	89.8							
4.00E+08	Не поко- ящиеся	2.83	95	0.47	0.69	56.7	42.2	2.51	0.32	8.19	89							
8.00E+08	Не поко- ящиеся	2.85	95.6	0.34	0.58	55.4	43.6	2.26	0.29	8.37	89.1							
1.00E+08	Покоя- щиеся	5.78	90.4	1.1	0.78	55.1	43	1.05	0.32	12.8	85.9							
4.00E+08	Покоя- щиеся	5.74	90	0.86	0.82	61.1	37.2	1.11	0.32	13.6	85							
8.00E+08	Покоя- щиеся	7.64	87.5	1.42	1.07	60.5	37	1.18	0.32	17.1	81.4							