

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992657 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.17

(51) Int. Cl. C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0781 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.05.10

(54) РАЗМНОЖЕНИЕ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ЖИДКИХ ОПУХОЛЕЙ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/504,337; 62/530,681; 62/550,398;
62/590,034; 62/621,462; 62/621,798;
62/647,367

(71) Заявитель:
АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

(32) 2017.05.10; 2017.07.10; 2017.08.25;
2017.11.22; 2018.01.24; 2018.01.25;
2018.03.23

(72) Изобретатель:
Кариампуди Лавакумар, Фардис
Мария (US)

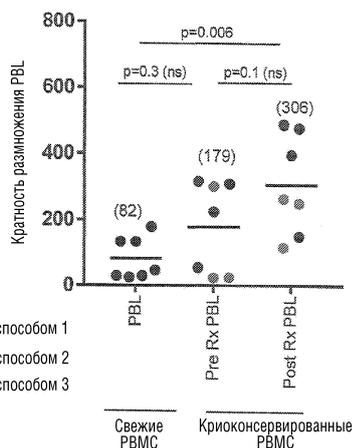
(33) US

(86) PCT/US2018/032109

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

(87) WO 2018/209115 2018.11.15

(57) В настоящем изобретении предлагаются способы размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включая лимфоциты периферической крови и лимфоциты, инфильтрирующие костный мозг, из крови и/или костного мозга пациентов со злокачественными опухолями системы крови, такими как опухоли жидких тканей, включая лимфомы и лейкозы, и применение таких размноженных ОИЛ для лечения заболеваний, таких как злокачественные опухоли и злокачественные опухоли системы крови.



A1

201992657

201992657

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 559734EA/17

РАЗМНОЖЕНИЕ ОПУХОЛЬ–ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ЖИДКИХ ОПУХОЛЕЙ И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА СВЯЗАННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/504337, поданной 10 мая 2017 года; предварительной заявки США № 62/530681, поданной 10 июля 2017 года; предварительной заявки США № 62/550398, поданной 25 августа 2017 года; предварительной заявки США № 62/590034, поданной 22 ноября 2017 года; предварительной заявки США № 62/621462, поданной 24 января 2018 года; предварительной заявки США № 62/621798, поданной 25 января 2018 года; и предварительной заявки США № 62/647367, поданной 23 марта 2018 года, каждая из которых включена в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе описаны способы размножения опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), полученных из крови и/или костного мозга пациента со злокачественной опухолью системы крови, такой как опухоль жидких тканей, включая лимфомы и лейкозы, и композиции, включающие популяции ОИЛ, которые получены из таких опухолей. Кроме того, в настоящем документе описаны терапевтические применения ОИЛ, размноженных из крови или костного мозга пациента со злокачественной опухолью системы крови, такой как опухоль жидких тканей, включая применение для лечения таких злокачественных опухолей системы крови.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ ИЗОБРЕТЕНИЮ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Лечение массивных рефрактерных злокачественных опухолей с использованием адоптивного аутологичного переноса опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) представляет собой перспективный подход к терапии пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, et al., *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 383–393. В ОИЛ преобладают Т–клетки, и размножение ОИЛ на основе ИЛ–2 с последующим «процессом быстрого размножения» (REP) стало предпочтительным способом размножения ОИЛ из–за его скорости и эффективности. Dudley, et al., *Science* 2002 298850–54; 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**, 257238–41; Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332–42. С ограниченным успехом был изучен ряд подходов для улучшения ответов на терапию с ОИЛ при меланоме и для распространения терапии с ОИЛ на другие типы опухолей, и эта область остается сложной. Goff, et al., *J. Clin. Oncol.* **2016**, 34, 2389–97; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233–39; Rosenberg, et al., *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 4550–57. Предыдущие подходы к размножению ОИЛ из В–клеточных лимфом дали плохие результаты, только 2 из 12 попыток роста ОИЛ обеспечивали потенциальную активность против опухолей. Schwartzenuber, et al., *Blood* **1993**, 82, 1204–1211. Существует острая необходимость в обеспечении более эффективных способов лечения многих злокачественных опухолей

системы крови, включая острый миелолейкоз (ОМЛ) и хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

Настоящее изобретение относится к удивительному открытию, что способы размножения ОИЛ могут приводить к эффективным популяциям ОИЛ, полученным из злокачественных опухолей системы крови, таких как опухоли жидких тканей, включая лимфомы или лейкозы.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(a) необязательного предварительного лечения пациента по схеме лечения, включающей, по меньшей мере, один ингибитор киназы;

(b) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(c) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(d) проведение начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, и где начальное размножение проводят в течение периода в 21 сутки или меньше;

(e) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(f) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(g) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(a) необязательного предварительного лечения пациента по схеме лечения, включающей, по меньшей мере, один ингибитор киназы;

(b) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной

биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(с) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(d) проведение начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, и где начальное размножение проводят в течение периода в 21 день или меньше;

(е) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 дней или меньше;

(f) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(g) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, выбранную из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV).

В варианте осуществления изобретения, способ дополнительно содержит добавление ингибитора ИТК. В варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют к среде для культивирования клеток во время, по меньшей мере, одного из этапов (d) и (е). В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК представляет собой ковалентный ингибитор ИТК, который ковалентно и необратимо связывается с ИТК. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК представляет собой аллостерический ингибитор ИТК, который связывается с ИТК. В другом варианте осуществления ингибитор

ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб, дазатиниб, босутиниб, нилотиниб, эрлотиниб BMS509744, СТА056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-акрилоилпиперидин-3-ил)-4-амино-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-N-(3-метил-4-(1-метилэтил)бензамид), и их сочетания. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой (R)-3-(1-(1-акрилоилпиперидин-3-ил)-4-амино-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-N-(3-метил-4-(1-метилэтил)бензамид.

Вышеуказанные ингибиторы ИТК коммерчески доступны в различных источниках, включая Tocris Bioscience, Inc. (Minneapolis, MN, USA), Selleckchem, Inc. (Houston, TX, USA), и AK Scientific, Inc. (Union City, CA, USA). В другом варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 0,1 нМ до приблизительно 5 мкМ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 0,1 нМ до приблизительно 5 мкМ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 0,1 нМ до приблизительно 100 нМ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 0,5 нМ до приблизительно 50 нМ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 1 нМ до приблизительно 10 нМ. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 2 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 300 нМ, 400 нМ, 500 нМ, 600 нМ, 700 нМ, 800 нМ, 900 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, и 50 мкМ.

В варианте осуществления изобретения, способ для размножения лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови включает:

- a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из периферической крови, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;
- b. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ B-клеток;
- c. Необязательное совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ B-клетками;
- d. Стимуляцию указанных PBL в первой среде для культивирования клеток с IL-2 и антителами к CD3/CD28 в течение периода приблизительно от 2 суток до 6 суток в газопроницаемом контейнере;
- e. Культивирование PBL из этапа (d) в течение периода приблизительно от 2 суток

до приблизительно 6 суток с IL-2 и антителами к CD3/CD28;

f. Выделение связанных с антителами PBL из культуры на этапе (e);

g. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (e); и

h. Сбор PBL.

В варианте осуществления изобретения, способ дополнительно включает добавление IL-2 после этапа (d), и замену первой среды для культивирования на вторую среду для культивирования клеток. В другом варианте осуществления способ дополнительно включает добавление IL-2 после этапа (e), и замену второй среды для культивирования на третью среду для культивирования. В варианте осуществления, первая среда для культивирования клеток, вторая среда для культивирования клеток, или третья среда для культивирования выбраны из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V. В другом варианте осуществления первая и вторая среды для культивирования клеток являются одинаковыми. В другом варианте осуществления первая и вторая среды для культивирования клеток являются разными. В варианте осуществления изобретения, одна или несколько из первой, второй и третьей сред для культивирования клеток являются одинаковыми. В другом варианте осуществления первая, вторая и третья среды для культивирования клеток являются разными.

В варианте осуществления, необязательное совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ В-клетками проводят в течение периода от 1 часа до 3 суток.

В варианте осуществления изобретения, соотношение Т-клеток к В-клеткам на этапе (c) составляет приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1 (В-клетки:Т-клетки). В другом варианте осуществления соотношение В-клеток к Т-клеткам на этапе (c) выбрано из группы, состоящей из 0,1:1, 1:1, и 10:1 (В-клетки:Т-клетки).

В варианте осуществления изобретения, начальное число клеток PBL в начале этапа (d) составляет, по меньшей мере, приблизительно от 1×10^5 до приблизительно 10×10^5 PBL. В другом варианте осуществления начальное число клеток PBL в начале этапа (d) составляет, по меньшей мере, приблизительно от $2,5 \times 10^5$ до 10×10^5 PBL. В другом варианте осуществления начальное число клеток PBL в начале этапа (d) составляет, по меньшей мере, 5×10^5 PBL.

В варианте осуществления изобретения, IL-2 на каждом из этапов (c) и (d) применяют в концентрации приблизительно от 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл. В другом варианте осуществления IL-2 на каждом из этапов (c) и (d) применяют в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл.

В варианте осуществления изобретения, антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы. В варианте осуществления изобретения, антитела к CD3/CD28 представляют собой DynaBeads[®]. В варианте осуществления, способ включает совместное культивирование гранул с антителами к CD3/CD28 с PBL в соотношении приблизительно 1:1 гранулы:PBL на каждом из этапов (c) и (d).

В варианте осуществления изобретения способ включает добавление ингибитора

ИТК. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют во время, по меньшей мере, одного из этапов (с), (d) и (е). В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб, дазатиниб, босутиниб, нилотиниб, эрлотиниб BMS509744, СТА056, GSK2250665A, PF06465469, и их сочетания. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб.

В варианте осуществления изобретения, любой из вышеуказанных способов для получения PBL проводят в закрытой стерильной системе.

В варианте осуществления настоящего изобретения, способ для размножения лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови включает:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из периферической крови, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ B-клеток;

c. Совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ B-клетками в течение 4 суток;

d. Добавление приблизительно от $2,5 \times 10^5$ до приблизительно 5×10^5 клеток в газопроницаемый контейнер в среду для культивирования клеток CM-2 и стимуляцию указанных PBL 3000 МЕ/мл IL-2 и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах в течение периода приблизительно от 4 суток;

e. Замену CM-2 средой для культивирования клеток AIM-V и дополнительным IL-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл;

f. Культивирование PBL из этапа (e) в течение дополнительного периода приблизительно 3 суток с IL-2 и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах;

g. Выделение связанных с антителами PBL из культуры с этапа (f);

h. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (g); и

i. Сбор PBL.

В варианте осуществления изобретения, способ лечения злокачественной опухоли системы крови включает:

a. Получение образца PBMC из периферической крови пациента, страдающего от злокачественной опухоли системы крови;

b. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ B-клеток;

с. Необязательное совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ В-клетками;

d. Стимуляцию указанных PBL в первой среде для культивирования клеток с IL-2 и антителами к CD3/CD28 в течение периода, по меньшей мере, 4 суток в газопроницаемом контейнере;

e. Культивирование PBL из этапа (d) в течение периода 3 суток с IL-2 и антителами к CD3/CD28;

f. Выделение связанных с антителами PBL из культуры с этапа (e);

g. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (e); и

h. Сбор PBL;и

i. Введение PBL пациенту в терапевтически эффективном количестве для лечения указанной злокачественной опухоли системы крови.

В варианте осуществления изобретения, способ дополнительно включает получение образца РВМС от пациента, которого предварительно лечили ингибитором ИТК. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ. В варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб, дазатиниб, босутиниб, нилотиниб, эрлотиниб BMS509744, СТА056, GSK2250665A, PF06465469, и их сочетания. В другом варианте осуществления ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб. В другом варианте осуществления пациента предварительно лечили, по меньшей мере, тремя курсами лечения по схеме лечения ибрутинибом.

В варианте осуществления изобретения, злокачественная опухоль системы крови выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV). В другом варианте осуществления злокачественная опухоль системы крови представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ). В варианте осуществления изобретения, PBL вводят в

количестве приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 PBL.

В варианте осуществления изобретения, способ для размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг (MIL), из костного мозга включает:

- a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;
- b. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ (фракция MIL) и клеточной фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ (ОМЛ-бластная клеточная фракция);
- c. Необязательное разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции;
- d. Добавление необязательно разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к фракции MIL в соотношении числа клеток приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1;
- e. Культивирование одной или обеих клеточных фракций в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей IL-2;
- f. Стимуляцию MIL антителами к CD3/CD28 для получения размножения MIL;
- g. Повторную стимуляцию MIL IL-2 и антителами к CD3/CD28 в течение дополнительного периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток;
- h. Культивирование MIL с дополнительным IL-2 в течение дополнительного периода приблизительно от 1 до приблизительно 3 суток; и
- i. Сбор указанных MIL.

В варианте осуществления изобретения, способ дополнительно включает добавление IL-2 после этапа (e), и замену первой среды для культивирования на вторую среду для культивирования клеток. В варианте осуществления, первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток выбраны из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V. В другом варианте осуществления первая и вторая среды для культивирования клеток являются одинаковыми. В другом варианте осуществления первая и вторая среды для культивирования клеток являются разными.

В варианте осуществления, по меньшей мере, приблизительно от 2×10^4 до приблизительно 5×10^5 MIL находятся в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e). В другом варианте осуществления, по меньшей мере, приблизительно от $2,8 \times 10^4$ до $3,4 \times 10^5$ MIL находятся в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e). В другом варианте осуществления, по меньшей мере, 5×10^5 MIL находятся в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

В варианте осуществления изобретения, IL-2 присутствует в концентрации от 1000 ME/мл и до 6000 ME/мл на этапе (e). В другом варианте осуществления IL-2 присутствует в концентрации приблизительно 6000 ME/мл. В другом варианте осуществления IL-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 ME/мл на этапе (g). В другом варианте осуществления IL-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 ME/мл на этапе (h).

В варианте осуществления изобретения, культивирование на этапе (e) проводят в

течение периода приблизительно 3 суток. В варианте осуществления, стимуляцию на этапе (f) проводят в течение периода приблизительно 4 суток. В варианте осуществления, стимуляцию на этапе (g) проводят в течение периода приблизительно 7 суток.

В варианте осуществления изобретения, необязательно разрушенную клеточную фракцию разрушают при помощи способа, выбранного из группы, состоящей из ультразвука, гомогенизации, вортексирования, вибрации и лизиса. В варианте осуществления изобретения, не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ клеточную фракцию (ОМЛ-бластную фракцию) лизируют при помощи подходящего способа лизиса, включая высокотемпературный лизис, химический лизис (такой как при помощи органических спиртов), ферментативный лизис и другие способы лизиса клеток, известные в данной области.

В варианте осуществления изобретения, антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы, и соотношение МПЛ:гранулы составляет приблизительно 1:1 на каждом из этапов (f) и (g).

В варианте осуществления изобретения способ проводят в закрытой стерильной системе.

В варианте осуществления изобретения, способ для размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг (МПЛ), из костного мозга включает:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ (фракция МПЛ) и клеточной фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ (ОМЛ-бластная клеточная фракция);

c. Разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции и добавление разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к фракции МПЛ в соотношении числа клеток приблизительно 1:1;

d. Культивирование клеточных фракций в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 в концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл в течение периода приблизительно от 3 суток;

e. Добавление антител к CD3/CD28, иммобилизованных на гранулах, к клеточной культуре в соотношении приблизительно 1:1 (МПЛ:гранулы) и культивирование МПЛ и антител в течение периода приблизительно от 1 суток;

f. Замену первой среды для культивирования клеток на вторую среду для культивирования клеток, содержащую дополнительный ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл;

g. Культивирование антител и МПЛ в течение дополнительного периода приблизительно 3 суток

h. Повторную стимуляцию МПЛ ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах, в течение дополнительного периода, по меньшей мере, приблизительно 4 суток;

i. Замену второй среды для культивирования клеток на третью среду для культивирования клеток, содержащую дополнительный ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл, в течение дополнительного периода, по меньшей мере, приблизительно 3 суток;

j. Сбор указанных МП.

В варианте осуществления изобретения, способ лечения злокачественной опухоли системы крови включает:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ (фракция МП) и клеточной фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ (ОМЛ-бластная клеточная фракция);

c. Необязательное разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции;

d. Добавление необязательно разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к фракции МП в соотношении числа клеток приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1;

e. Культивирование одной или обеих клеточных фракций в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2;

f. Стимуляцию указанного образца антителами к CD3/CD28;

g. Повторную стимуляцию МП ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28 в течение дополнительного периода приблизительно 4 суток;

h. Культивирование МП с дополнительным ИЛ-2 в течение дополнительного периода приблизительно 3 суток;

i. Сбор указанных МП; и

j. Введение указанных МП пациенту в терапевтически эффективном количестве для лечения злокачественной опухоли системы крови.

В варианте осуществления изобретения, злокачественная опухоль системы крови выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV). В другом варианте осуществления злокачественная опухоль системы крови представляет собой острый миелолейкоз (ОМЛ).

В варианте осуществления изобретения, МП вводят в количестве приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ МП.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеуказанная сущность изобретения, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятны в сочетании с прилагаемыми чертежами.

ФИГ. 1 иллюстрирует информацию о гистологии лимфомных опухолей.

ФИГ. 2 иллюстрирует сравнение различных подгрупп ОИЛ лимфомы и меланомы, показывая, что подгрупп с эффекторной памятью (ЕМ) среди ОИЛ лимфомы значимо больше, чем подгрупп ЕМ среди ОИЛ меланомы.

ФИГ. 3 иллюстрирует сравнение различных подгрупп ОИЛ лимфомы и меланомы, показывая, что подгрупп $CD28^+CD4^+$ среди ОИЛ лимфомы значимо больше, чем этих же подгрупп среди ОИЛ меланомы.

ФИГ. 4 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD4^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры дифференцировки. Красные линии на графиках показывают значения медиан. СМ относится к Т-клеткам центральной памяти, ЕМ относится к Т-клеткам эффекторной памяти, и ТЕМРА относится к $CD45RA^+$ Т-клеткам эффекторной памяти.

ФИГ. 5 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD8^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры дифференцировки. Красные линии на графиках показывают значения медиан. СМ относится к Т-клеткам центральной памяти, ЕМ относится к Т-клеткам эффекторной памяти, и ТЕМРА относится к $CD45RA^+$ Т-клеткам эффекторной памяти.

ФИГ. 6 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD4^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры истощения. Красные линии на графиках показывают значения медиан. LAG3 относится к лимфоцит-активирующему гену 3, PD1 относится к белку программируемой смерти 1, и TIGIT относится к Т-клеточному иммунорецептору с Ig- и ITI-доменами.

ФИГ. 7 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD8^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры истощения. Красные линии на графиках показывают значения медиан. LAG3 относится к лимфоцит-активирующему гену 3, PD1 относится к белку программируемой смерти 1, и TIGIT относится к Т-клеточному иммунорецептору с Ig- и ITI-доменами.

ФИГ. 8 иллюстрирует сравнение типов клеток между ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы. НК относится к клеткам-естественным киллерам, и TCRab относится к клеткам, экспрессирующим Т-клеточный рецептор с альфа- и бета-цепями.

ФИГ. 9 иллюстрирует результаты анализов биолюминисцентного перенаправленного лизиса (BRLA).

ФИГ. 10 иллюстрирует результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для интерферона- γ (IFN- γ) для ОИЛ лимфомы по сравнению с ОИЛ меланомы.

ФИГ. 11 иллюстрирует результаты анализа иммуноферментных пятен (ELISpot) для

ОИЛ лимфомы.

ФИГ. 12 иллюстрирует результаты анализа ELISpot для ОИЛ меланомы.

ФИГ. 13 иллюстрирует результаты анализа NANOSTRING NCOUNTER, показывая что ОИЛ лимфомы экспрессируют более высокие уровни RORC IL17A (Th17 phenotype) и GATA3 (Th2 phenotype) по сравнению ОИЛ меланомы. Соответствующие гены выделены красными рамками на тепловой карте.

ФИГ. 14 иллюстрирует размножение ОИЛ и процесс лечения. Этап 1 относится к добавлению 4 опухолевых фрагментов во флаконы G-Rex 10. На этапе 2 получают приблизительно 40×10^6 ОИЛ или больше. На этапе 3, проводят разделение во флаконы 36 G-Rex 100 для REP. ОИЛ собирают посредством центрифугирования на этапе 4. Продукт из свежих ОИЛ получают на этапе 5 после общего времени обработки приблизительно 43 суток, и в этой точке ОИЛ можно вливать пациенту.

ФИГ. 15 иллюстрирует протокол лечения для применения ОИЛ, полученных из лимфом по настоящему изобретению. Хирургическое вмешательство (и удаление опухоли) происходят в начале, и иммуноистощающая химиотерапия относится к немиелоаблативному лимфоистощению с химиотерапией, как описано повсеместно в настоящем документе.

ФИГ. 16 демонстрирует результаты анализа проточной цитометрии с использованием панели стандартных фенотипов DF2, как описано в примере 4 ниже. ОИЛ лимфомы и меланомы окрашивали с использованием панели стандартных фенотипов DF2, как описано в примере 4. Показанные данные представляют различные субпопуляции общих CD4 и CD8 T-клеток в ОИЛ. Фигура 16A демонстрирует долю CD4 и CD8 клеток для подгрупп наивных T-клеток; фигура 16B для подгрупп T-клеток центральной памяти (CM); фигура 16C для подгрупп T-клеток эффекторной памяти (EM), и фигура 16D для подгрупп терминально-дифференцированных T-клеток эффекторной памяти (TEMRA). P-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна-Уитни (непарного). Средняя доля подгрупп клеток представлена горизонтальными столбиками.

ФИГ. 17 демонстрирует результаты анализа проточной цитометрии с использованием панели стандартных фенотипов DF1, как описано в примере 4 ниже. ОИЛ лимфомы и меланомы окрашивали с использованием панели стандартных фенотипов DF1, как описано в примере 4. Показанные данные представляют различные субпопуляции CD27+ (фиг. 17A) и CD28+ (фиг. 17B) общих CD4 и CD9 T-клеток в ОИЛ, которые указывают на более высокие доли CD4 T-клеток, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD28, в ОИЛ лимфомы. P-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна-Уитни (непарного).

ФИГ. 18 демонстрируют результаты теста на интерферон-гамма (IFN- γ), проведенного в соответствие с примером 4, ниже. ФИГ. 18A показывает результаты с использованием ELISpot. Данные ELISpot выражены в виде IFN- γ -продуцирующих клеток на 10^6 ОИЛ. ФИГ. 18B показывает результаты с использованием ELISA. Данные ELISA выражены в виде уровней IFN- γ в супернатантах из культур ОИЛ при 5×10^5 ОИЛ/лунку,

при измерении путем ELISA (логарифмическая шкала). Р-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна–Уитни (непарного).

ФИГ. 19 показывает литический потенциал ОИЛ. ФИГ. 19А показывает LU_{50} клеток–мишеней, нормализованных по 10^6 ОИЛ за 4 часа (фиг. 19А) и 24 часа (фиг. 19В) при совместном культивировании (эффекторные клетки ОИЛ с клетками–мишенями GFP+P815).

ФИГ. 20 показывает цитолитическую активность различных ОИЛ против аллогенных и аутологических типов опухолей. ФИГ. 20А показывает цитолитическую активность ОИЛ меланомы против аллогенных клеток–мишеней 526. ФИГ. 20В показывает цитолитическую активность ОИЛ лимфомы против аутологичных опухолевых клеток, определенную путем захвата 7–AAD. Данные на Фиг. 20А и 20В показаны в виде процента мертвых клеток при совместном культивировании в соотношении эффекторная клетка:клетка–мишень (Е:Т) 50:1. ФИГ. 20С представляет процент лизиса клеток–мишеней, индуцированного ОИЛ меланомы. ФИГ. 20D представляет процент лизиса клеток–мишеней, индуцированного ОИЛ лимфомы при различных соотношений Е:Т.

ФИГ. 21 представляет собой тепловую карту, показывающую профили экспрессии генов ОИЛ лимфомы и меланомы. Профили экспрессии определяли при помощи панели 579 plex nCounter GX Human Immunology V2 CSO от NanoString. Тепловая карта показывает кратное изменение экспрессии конкретного набора генов в ОИЛ лимфомы по сравнению с ОИЛ меланомы, и подтверждает более высокую экспрессию IL–17A и RORC в ОИЛ, полученных из лимфомы. Злокачественные опухоли, показанные на этой фигуре, включают фолликулярную лимфому (ФЛ), диффузную крупноклеточную В–клеточную лимфому (ДКВЛ) и лимфому мантийных клеток (ЛМК).

ФИГ. 22 представляет собой схему, демонстрирующую способ 2А для получения ОИЛ, сбор, и расписание отправки.

ФИГ. 23 представляет собой блок–схему, демонстрирующую способ 2А для получения ОИЛ.

ФИГ. 24 представляет собой блок–схему, демонстрирующую три различных способа для размножения лимфоцитов периферической крови (PBL).

ФИГ. 25А–25С представляет три различных способа для размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг, (MPL) из костного мозга.

ФИГ. 26 представляет кратное размножение для PBL, выделенных из свежих мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) и из криоконсервированных PBMC. Криоконсервированные PBMC получены от пациентов с ХЛЛ, которых не лечили (PreRx PBL) или лечили (PostRx PBL) схемой лечения с ибрутинибом. Для каждой из ФИГ. 26–34, каждая точка представляет одного пациента. Красные точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 1 для PBL; зеленые точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 2 для PBL; черные точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 3 для PBL.

ФИГ. 27 представляет график IFN- γ -продуцирующих клеток для PBL, выделенных из свежих PBMC и криоконсервированных PBMC. Среди криоконсервированных PBMC, также представлены PreRx PBL и PostRx PBL.

ФИГ. 28 представляет долю подгрупп CD4⁺ и CD8⁺ T-клеток у PreRx PBL и PostRx PBL, с использованием ОИЛ меланомы для сопоставления.

ФИГ. 29А–29D и ФИГ. 30А–30D представляют сравнения между подгруппами CD4 (фиг. 29) и CD8 (фиг. 30) клеток памяти из PreRx PBLs и PostRx PBLs, с использованием ОИЛ меланомы для сопоставления. ФИГ. 29А и 30А показывают данные для наивных (CCR7⁺/CD45RA⁺) T-клеток; ФИГ. 29В и 30В показывают данные для T-клеток центральной памяти (СМ) (CCR7⁺/CD45RA⁻); ФИГ. 29С и 30С показывают данные для T-клеток эффекторной памяти (ЕМ) (CCR7⁻/CD45RA⁻); и ФИГ. 29D и 30D показывают данные для терминально-дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7⁻/CD45RA⁺).

ФИГ. 31А и 31В представляют сравнение подгрупп CD27 из CD4 (фиг. 31А) и CD8 (фиг. 31В) подгрупп для PreRx PBLs и PostRx PBLs, с использованием ОИЛ меланомы для сопоставления.

ФИГ. 32А и 32В представляют сравнение подгрупп CD28 из CD4 (фиг. 32А) и CD8 (фиг. 32В) подгрупп для PreRx PBLs и PostRx PBLs, с использованием ОИЛ меланомы для сопоставления.

ФИГ. 33А и 33В представляют сравнение подгрупп LAG3⁺ в популяциях CD4 (фиг. 33А) и CD8 (фиг. 33В) для PreRx PBLs и PostRx PBLs.

ФИГ. 34А и 34В представляют сравнение подгрупп PD1⁺ в популяциях CD4 (фиг. 34А) и CD8 (фиг. 34В) для PreRx PBLs и PostRx PBLs.

ФИГ. 35А и 35В показывают результаты цитолитической активности of PreRx PBLs (фиг. 35А) и PostRx PBLs (FIG35В), измеренные с использованием анализа лизиса аутологичной опухоли. Цитотоксичность измеряют в виде LU₅₀ (число PBL, необходимых для лизиса 50% клеток-мишеней).

ФИГ. 36А и 36В представляют графики кратного размножения для МП (фиг. 36А) и PBL (фиг. 36В), выделенных или из костного мозга (МП) или из периферической крови (PBL) пациентов с ОМЛ. МП 1.1 размножали с использованием способа 1 для МП, МП1.2 размножали с использованием способа 2 для МП, и МП1.3 размножали с использованием способа 3 для МП. МП2 и МП3 размножали с использованием способа 3 для МП. All PBL размножали с использованием способа 3 для PBL. Начальное число клеток для МП1.3 составляло 138000 клеток, для МП2 составляло 62000 и для МП 3 составляло 28000 клеток. Начальное число клеток для PBL2 составляло 338000 и для PBL3 составляло 336000.

ФИГ. 37А и 37В показывают IFN- γ -продуцирующие клетки для каждого из МП (фиг. 37А) и PBL (фиг. 37В).

ФИГ. 38А–38F представляет график, иллюстрирующий подгруппы T-клеток в МП (ФИГ. 38А–38С) и PBL (ФИГ. 38D–38F), выделенных у пациентов с ОЛЛ. ФИГ. 38А и

38D показывают подгруппы TCR $\alpha\beta$ +, ФИГ. 38B и 38E показывают подгруппы CD4+, и ФИГ. 38C и 38F показывают подгруппы CD8. PBL показаны на Сутки 0 и на Сутки 14.

ФИГ. 39A–39D представляют графики, иллюстрирующие подгруппы клеток памяти CD4 для MFL, выделенных у пациентов с ОЛЛ. ФИГ. 39A показывает данные для наивных T–клеток (CCR7+/CD45RA+); ФИГ. 39B показывает данные для T–клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA–); ФИГ. 39C показывает данные для T–клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7–/CD45RA–); и ФИГ. 39D показывает данные для терминально–дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7–/CD45RA+).

ФИГ. 40A–40D представляют графики, иллюстрирующие подгруппы клеток памяти CD4 для PBL, выделенных у пациентов с ОЛЛ. ФИГ. 40A показывает данные для наивных T–клеток (CCR7+/CD45RA+); ФИГ. 40B показывает данные для T–клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA–); ФИГ. 40C показывает данные для T–клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7–/CD45RA–); и ФИГ. 40D показывает данные для терминально–дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7–/CD45RA+).

ФИГ. 41A–41D представляют графики, иллюстрирующие подгруппы клеток памяти CD8 для MFL, выделенных у пациентов с ОЛЛ. ФИГ. 41A показывает данные для наивных T–клеток (CCR7+/CD45RA+); ФИГ. 41B показывает данные для T–клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA–); ФИГ. 41C показывает данные для T–клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7–/CD45RA–); и ФИГ. 41D показывает данные для терминально–дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7–/CD45RA+).

ФИГ. 42A–42D представляют графики, иллюстрирующие подгруппы клеток памяти CD8 для PBL, выделенных у пациентов с ОЛЛ. ФИГ. 42A показывает данные для наивных T–клеток (CCR7+/CD45RA+); ФИГ. 42B показывает данные для T–клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA–); ФИГ. 42C показывает данные для T–клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7–/CD45RA–); и ФИГ. 42D показывает данные для терминально–дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7–/CD45RA+).

ФИГ. 43A и 43B представляют графики, иллюстрирующие подгруппы CD27 клеточных популяций CD4 и CD8 для MFL (фиг. 43A) и PBL (фиг. 43B).

ФИГ. 44A и 44B представляют графики, иллюстрирующие подгруппы CD28 клеточных популяций CD4 и CD8 для MFL (фиг. 44A) и PBL (фиг. 44B).

ФИГ. 45A и 45B представляют графики, иллюстрирующие подгруппы PD1+ клеточных популяций CD4 и CD8 для MFL (фиг. 45A) и PBL (фиг. 45B).

ФИГ. 46A и 46B представляют графики, иллюстрирующие подгруппы LAG3+ клеточных популяций CD4 и CD8 для MFL (фиг. 46A) и PBL (фиг. 46B).

ФИГ. 47 представляет график, показывающий иллюстративные варианты осуществления способа 1 для PBL и способа 3 для PBL. На этой фигуре, добавление IL–2

может происходить в любой временной точке во время процесса, и в иллюстративном варианте осуществления, над областью в скобках.

ФИГ. 48 представляет график, показывающий иллюстративный вариант осуществления способа 3 для МП. На этой фигуре, добавление П–2 может происходить в любой временной точке во время процесса, и в иллюстративном варианте осуществления, над областью в скобках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

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

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

SEQ ID NO:3 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка П–2.

SEQ ID NO:4 представляет собой аминокислотную последовательность алдеслейкина.

SEQ ID NO:5 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка П–4.

SEQ ID NO:6 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка П–7.

SEQ ID NO:7 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка П–15.

SEQ ID NO:8 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка П–21.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, в котором их обычно понимает специалист в области, к которой относится это изобретение. Все патенты и публикации, упомянутые в настоящем документе, включены в качестве ссылки в полном объеме.

Определения

Термины «совместное введение» «со–введение» «введенный в комбинации с», «введение в комбинации с», «одновременный» и «сопутствующий», как применяют в настоящем документе, включают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов индивидууму, таким образом, что оба активных фармацевтических ингредиента и/или их метаболиты присутствуют в индивидууме в одно и то же время. Со–введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в различное время в различных композициях, или введение в композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Предпочтительными являются одновременное введение в отдельных композициях и введение в композиции, в которой присутствуют оба агента.

Термин «in vivo» относится к событию, которое происходит в теле

млекопитающего.

Термин «ex vivo» относится к событию, которое происходит вне тела млекопитающего, в искусственном окружении.

Термин «in vitro» относится к событию, которое происходит в экспериментальной системе. Анализы in vitro включают анализы на основе клеток, в которых могут быть использованы живые или мертвые клетки, и могут также включать бесклеточный анализ, в котором не используют интактные клетки.

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

Термины «фрагментирование», «фрагмент» и «фрагментированный» применяют в настоящем документе для описания способов для разрушения опухоли, включая способы механического фрагментирования, такие как раздавливание, разрезание, разделение и разрушение опухолевой ткани, а также любой другой способ для разрушения физической структуры опухолевой ткани.

Термины «моноклеарные клетки периферической крови» и «РВМС» относятся к клеткам периферической крови с круглым ядро и включают лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, НК-клетки) и моноциты. Необязательно, моноклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови. Термин «PBL» относится к лимфоцитам периферической крови и представляет собой Т-клетки, размноженные из периферической крови. Термины PBL и ОИЛ используют взаимозаменяемо в настоящем документе.

Термин «антитело к CD3» относится к антителу или его варианту, например, моноклональному антителу, и включает человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которые нацелены против CD3-рецептора в антигенном Т-клеточном рецепторе зрелых Т-клеток. Антитела к CD3 включают ОКТ-3, также известное как муромонаб, и UCNT-1. Другие антитела к CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и висилизумаб.

Термин «ОКТ-3» (также обозначаемый в настоящем документе как «ОКТ3») относится к моноклональному антителу или биоподобному антителу или к его варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которые нацелены против CD3-рецептора в антигенном Т-клеточном рецепторе зрелых Т-клеток, и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) и муромонаб или варианты, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, или его биоаналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3,

хранится в Американской коллекции типовых культур под номером доступа ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также хранится в Европейской коллекции аутентичных клеточных культур (ECACC) под каталожным номером 86022706.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотные последовательности муромонаба.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:1 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

Термин «IL-2» (также обозначаемый в настоящем документе как «IL2») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-2, и включает все формы IL-2, в том числе человеческие формы и формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги или его варианты. IL-2 описан, например, у Nelson, J. Immunol. 2004 1723983–88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. **2008**, 26, 453–79, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-2, подходящего для использования по изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO:3). Например,

термин IL-2 включает человеческие рекомбинантные формы IL-2, такие как алдеслейкин (PROLEUKIN, доступный коммерчески у множества поставщиков во флаконах для однократного использования по 22 миллиона ME), а также форму рекомбинантного IL-2, коммерчески доступного у CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Каталожный номер CYT-209-b) и другие коммерческие эквиваленты от других продавцов. Алдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125 человеческий IL-2) представляет собой негликозилированную человеческую рекомбинантную форму IL-2 с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Аминокислотная последовательность алдеслейкина, подходящего для использования по изобретению, дана в таблице 2 (SEQ ID NO:4). Термин IL-2 также включает пегилированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пегилированное пролекарственное средство NKTR-214 на основе IL2, доступное у Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 и пегилированный IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0328791 A1 и публикации международной патентной заявки № WO 2012/065086 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Составы IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в патенте США № 6706289, the содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

ТАБЛИЦА 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы 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 Алдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 Рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 Рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLD SMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTOIJI LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 Рекомбинантный человеческий IL-15 (rhIL-15)	MNWWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 Рекомбинантный человеческий IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

Термин «IL-4» (также обозначаемый в настоящем документе как «IL4») относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который вырабатывается Th2 Т-клетками и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференцировку наивных хелперных Т-клеток (Th0-клеток) в Th2 Т-клетки. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001**, 2, 66–70. После активации IL-4, Th2 Т-клетки затем вырабатывают дополнительный

IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II, и индуцирует переключение классов на экспрессию IgE и IgG₁ в В-клетках. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен у множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Каталожный номер СУТ-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-15, Каталожный номер Gibco СТР0043). Аминокислотная последовательность IL-4, подходящего для использования по изобретению, дана в таблице 2 (SEQ ID NO:5).

Термин «IL-7» (также обозначаемый в настоящем документе как «IL7») относится к гликозилированному тканевому цитокину, известному как интерлейкин 7, который можно получать из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, Blood **2002**, 99, 3892-904. IL-7 может стимулировать развитие Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором для IL-7, гетеродимером, состоящим из рецептора альфа для IL-7 и общего рецептора для гамма-цепи, который передает серию сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен у множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Каталожный номер СУТ-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-7, Каталожный номер Gibco РНС0071). Аминокислотная последовательность IL-7, подходящего для использования по изобретению, дана в таблице 2 (SEQ ID NO:6).

Термин «IL-15» (также обозначаемый в настоящем документе как «IL15») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-15, и включает все формы IL-15, в том числе человеческие формы и формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги или его варианты. IL-15 описан, например, у Fehniger and CaligMERi, Blood 2001, 97, 14-32, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. IL-15 имеет общие субъединицы β и γ сигнального рецептора с IL-2. Рекомбинантный человеческий IL-15 представляет собой не-гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-15 коммерчески доступен у множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Каталожный номер СУТ-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок IL-15, Каталожный номер 34-8159-82). Аминокислотная последовательность IL-15, подходящего для использования по изобретению, дана в таблице 2 (SEQ ID NO:7).

Термин «IL-21» (также обозначаемый в настоящем документе как «IL21») относится к плейотропному цитокиновому белку, известному как интерлейкин-21, и включает все формы IL-21, в том числе человеческие формы и формы млекопитающих, консервативные аминокислотные замены, гликоформы, биоаналоги или его варианты. IL-

21 описан, например, у Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. **2014**, 13, 379–95, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. ИЛ–21 первично вырабатывается Т–клетками естественными киллерами и активированными человеческими CD4⁺ Т–клетками. Рекомбинантный человеческий ИЛ–21 представляет собой, негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий ИЛ–21 коммерчески доступен у множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Каталожный номер СУТ–408–b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (человеческий рекомбинантный белок ИЛ–21, Каталожный номер 14–8219–80). Аминокислотная последовательность ИЛ–21, подходящего для использования по изобретению, дана в таблице 2 (SEQ ID NO:8).

Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый эксципиент» предназначены для обозначения любых растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и замедляющих абсорбцию агентов и инертных ингредиентов. Применение таких фармацевтически приемлемых носителей или фармацевтически приемлемых эксципиентов для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любой общепринятый фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый эксципиент несовместим с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается его использование в терапевтических композициях по изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

Термин «антитело» и его форма множественного числа «антитела» относится к целым иммуноглобулинам и их любому антигенсвязывающему фрагменту («антигенсвязывающая часть») или одиночной цепи. «Антитело» дополнительно относится к гликопротеину, содержащему, по меньшей мере, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, или их антигенсвязывающую часть. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенной в настоящем документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, СН1, СН2 и СН3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенной в настоящем документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, С_L. Области антитела V_H и V_L могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, которые обозначают как определяющие комплементарность области (CDR) или гипервариабельные области (HVR), и которые могут перемежаться более консервативными областями, которые называются каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino–конца к карбокси–концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат

связывающий домен, который взаимодействует с антигенным эпитопом или эпитопами. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин «антиген» относится к веществу, которое вызывает иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления антиген представляет собой молекулу, которую способно связывать антитело или TCR, если она презентируется при помощи молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС). Как применяют в настоящем документе, термин «антиген» также включает Т-клеточные эпитопы. Антиген дополнительно способен распознаваться иммунной системой. В некоторых вариантах осуществления антиген способен индуцировать гуморальный иммунный ответ или клеточный иммунный ответ, ведущий к активации В-лимфоцитов и/или Т-лимфоцитов. В некоторых случаях, может быть необходимо, чтобы антиген содержал Th-клеточный эпитоп или связан с ним. Антиген могут также содержать один или несколько эпитопов (например, В- и Т-эпитопы). В некоторых вариантах осуществления антиген будет предпочтительно реагировать, как правило, высокоспецифичным и избирательным образом с соответствующим антителом или TCR, а не с множеством других антител или TCR, которые могут быть индуцированы другими антигенами.

Термины «моноклональное антитело», «mAb», «композиция моноклональных антител» или их формы множественного числа относятся к препаратам молекул антитела одного молекулярного состава. Композиция моноклональных антител демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Моноклональные антитела, специфичные к определенным рецепторам, можно получать с использованием знаний и навыков в данной области, инъецируя экспериментальных индивидуумов подходящими антигенами, а затем выделяя гибридомы, экспрессирующие антитела с желаемой последовательностью или функциональными характеристиками. ДНК, кодирующую моноклональные антитела, легко выделять и секвенировать при помощи общепринятых способов (например, при помощи олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Гибридомные клетки служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как *E. coli* клетки, клетки мартышек COS, клетки яичника китайского хомяка (СНО), или миеломные клетки, которые иначе не производят белок иммуноглобулина, для получения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. Рекомбинантная выработка антител будет описана более подробно далее.

Термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела (или просто «часть антитела» или «фрагмент»), как применяют в настоящем документе, относятся к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Показано, что антигенсвязывающую

функцию антитела можно осуществлять фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, включенных в термин «антигенсвязывающая часть» антитела включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и $CH1$; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, который содержит два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, который состоит из доменов V_H и $CH1$; (iv) Fv-фрагмент, который состоит из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент доменного антитела (dAb) (Ward, et al., Nature, 1989 341 544–546), который может состоять из домена V_H или V_L ; и (vi) выделенную определяющую комплементарную область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединить с использованием рекомбинантных способов, при помощи синтетического линкера, который позволяет производить их в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединены для образования моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird, et al., Science **1988** 242 423–426; и Huston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1988**, 85, 5879–5883). Такие scFv антитела также включены в термины «антигенсвязывающая часть» или «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Эти фрагменты антител получают при помощи общепринятых способов, известных специалистам в данной области, проводят скрининг фрагментов на их свойства тем же самым образом, что и интактные антитела.

Как применяют в настоящем документе, термин «антитело человека», включает антитела с переменными областями, в которых и каркасные и CDR области получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии человека (например, мутации, введенные путем случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или путем соматической мутации *in vivo*). Как применяют в настоящем документе термин «антитело человека» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, привиты на каркасные последовательности человека.

Термин «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, демонстрирующим одну специфичность связывания, которые имеют переменные области с областями каркаса и CDR, полученными из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В варианте осуществления, человеческие моноклональные антитела получают при помощи гибридомы, которая содержит В-клетку, полученную из трансгенного, не относящегося к человеку животного, например, из трансгенной мыши, геном которой содержит трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека, слитые в иммортализованной клетке.

Как применяют в настоящем документе, термин «рекомбинантное антитело

человека» включает все антитела человека, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют рекомбинантными способами, такие как (а) антитела, выделенные из животного (такого как мышь), которое является трансгенным или трансхромосомным по гена иммуноглобулина человека, или из гибридомы, полученной из таких животных (описана дополнительно далее), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антитела человека, например, из трансфектомы, (с) антитела, выделенные рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими методами, которые включают сплайсинг генетических последовательностей иммуноглобулина человека относительно других последовательностей ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные области, в которых области каркаса и CDR получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления однако, такие рекомбинантные антитела человека можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или когда используют животное трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантного антитела представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из последовательностей V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не существовать в природе в репертуаре антител зародышевой линии человека *in vivo*.

Как применяют в настоящем документе, «изотип» относится к классу антитела (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Фразы «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфичное к антигену» используют взаимозаменяемо в настоящем документе с термином «антитело, которое специфически связывается с антигеном».

Термин «производные человеческого антитела» относится к любой модифицированной форме антитела человека, включая конъюгат антитела и другого активного фармацевтического ингредиента или антитела. Термины «конъюгат», «конъюгат антитело–лекарственное средство», «ADC» или «иммуноконъюгат» относится к антителу или его фрагменту, конъюгированному с другой терапевтической группой, которая может быть конъюгирована с антителами, описываемыми в настоящем документе при помощи способов, доступных в данной области.

Термины «гуманизированное антитело», «гуманизированные антитела» и «гуманизированный» относятся к антителам, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на последовательности каркаса человека. Внутри каркасных последовательностей человека можно производить дополнительные модификации. Гуманизированными формами не принадлежащих человеку (например, мышинных) антител являются химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из не принадлежащего человеку иммуноглобулина.

Преимущественно, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены остатками из 15 гипервариабельной области не являющегося человеком вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или не являющийся человеком примат, имеющего желаемую специфику, аффинность и вместимость. В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменяют соответствующими не принадлежащими человеку остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации сделаны для дальнейшего совершенствования производительности антитела. В основном, гуманизированное антитело будет включать в себя по существу все, по меньшей мере, из одного, и, как правило, двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют таковым не принадлежащего человеку иммуноглобулина, и все или по существу все области FR представляют собой последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Более подробно, см. Jones, et al., Nature **1986**321522–525; Riechmann, et al., Nature **1988**332323–329; и Presta, Curr. Op. Struct. Biol. **1992**, 2, 593–596. Антитела, описываемые в настоящем документе, можно также модифицировать для использования любого варианта Fc, который, как известно, дает улучшение (например, снижение) эффекторной функции и/или связывания с FcR. Варианты Fc могут включать, например, любую из замен аминокислот, описанных в публикации международной патентной заявки №№. WO 1988/07089 A1, WO 1996/14339 A1, WO 1998/05787 A1, WO 1998/23289 A1, WO 1999/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 2000/09560 A2, WO 2000/32767 A1, WO 2000/42072 A2, WO 2002/44215 A2, WO 2002/060919 A2, WO 2003/074569 A2, WO 2004/016750 A2, WO 2004/029207 A2, WO 2004/035752 A2, WO 2004/063351 A2, WO 2004/074455 A2, WO 2004/099249 A2, WO 2005/040217 A2, WO 2005/070963 A1, WO 2005/077981 A2, WO 2005/092925 A2, WO 2005/123780 A2, WO 2006/019447 A1, WO 2006/047350 A2, и WO 2006/085967 A2; и патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; и 7083784; содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «химерное антитело» предназначен для обозначения антител, в которых последовательности вариабельной области получены из одного вида, а последовательности константной области получены из другого вида, таких как антитело, в котором последовательности вариабельной области получены из мышинового антитела, а последовательности константной области получены из антитела человека.

«Диатело» представляет собой небольшой фрагмент антитела с двумя антигенсвязывающими участками. Фрагменты содержат вариабельный домен тяжелой цепи (VH), соединенный с вариабельным доменом легкой цепи (VL) в той же

полипептидной цепи (VH–VL или VL–VH). Используя линкер, который слишком короткий, чтобы разрешить спаривание между двумя доменами в одной цепи, домены принуждают к спариванию с комплементарными доменами другой цепи и созданию двух антигенсвязывающих участков. Диатела описаны более полно, например, в европейском патенте № EP 404,097, международной патентной публикации № WO 93/11161; и Bolliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **1993**, 90, 6444–6448.

Термин «гликозилирование» относится к модифицированному производному антитела. У негликозилированного антитела отсутствует гликозилирование. Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к антигену. Такие модификации углеводов могут быть выполнены, например, путем изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, может быть произведена замена одной или нескольких аминокислот, что приведет к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы тем самым устранить гликозилирование в этом сайте. Агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену, как описано в патентах США №№ 5714350 и 6350861. Дополнительно или альтернативно может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, так как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества фукозильных остатков или антитело, имеющее увеличение разветвленных структур GlcNac. Было показано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают способности антител. Такие углеводные модификации могут быть выполнены, например, путем экспрессии антитела в клетке–хозяине с измененной машинерией для гликозилирования.

Клетки с измененной машинерией для гликозилирования были описаны в данной области и их можно использовать в качестве клеток–хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по изобретению и, таким образом, производить антитело с измененным гликозилированием. Например, у клеточных линий Ms704, Ms705, и Ms709 отсутствует ген фукозилтрансферазы, FUT8 (альфа (1,6) фукозилтрансфераза), и таким образом, у антител, которые экспрессируются в клеточных линиях Ms704, Ms705, и Ms709, среди углеводов отсутствует фукоза. Клеточные линии Ms704, Ms705, и Ms709 FUT8–/– были созданы путем нацеленного разрушения гена FUT8 в клетках CHO/DG44 с использованием двух замещающих векторов (см. например, патентную публикацию США № 2004/0110704 или Yamane–Ohnuki, et al., Biotechnol. Bioeng., **2004**, 87, 614–622). В качестве другого примера, Европейский патент № EP 1176195 описывает клеточную линию с функционально разрушенным геном FUT8, кодирующим фукозилтрансферазу, так что антитела, экспрессирующиеся в такой клеточной линии, демонстрируют гипофукозилирование за счет уменьшения или удаления фермента для альфа–1,6 связи, и также описывает клеточные линии, которые имеют низкую ферментативную активность по добавлению фукозы к N–ацетилглюкозамину, который связывается с Fc–областью антитела, или у них отсутствует ферментативная активность,

например, клеточная линия миеломы крысы YB2/0 (ATCC CRL 1662). Международная Патентная публикация WO 03/035835 описывает вариант клеточной линии CHO, клетки Lec 13, со сниженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)–связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилации антител, экспрессирующихся в такой клетке–хозяине (см. also Shields, et al., J. Biol. Chem. **2002**27726733–26740. Международная Патентная публикация WO 99/54342 описывает клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин–модифицирующей гликозилтрансферазы (например, бета(1,4)–N–ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), таким образом, антитела, экспрессирующиеся в сконструированных клеточных линиях демонстрируют увеличение разветвленных структур GlcNac, что приводит к повышению активности ADCC у антител (см. also Umana, et al., Nat. Biotech. **1999**, 17, 176–180). Альтернативно, остатки фукозы в антителе можно вырезать при помощи фермента фукозидазы. Например, фукозидаза альфа–L–фукозидаза удаляет фукозильные остатки с антител, как описано у Tarentino, et al., Biochem. **1975**, 14, 5516–5523.

«Пегилирование» относится к модифицированному антителу или его фрагменту, который, как правило, реагирует с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реактивное сложноэфирное или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, когда одна или несколько групп ПЭГ присоединяются к антителу или фрагменту антитела. Пегилирование может, например, увеличить биологический (например, сывороточный) период полувыведения антитела. Предпочтительно, пегилирование проводят посредством реакции ацилирования или реакции алкилирования с реактивной молекулой ПЭГ (или аналогичным реактивным водорастворимым полимером). Как применяют в настоящем документе, термин «полиэтиленгликоль» предназначен для включения любой из форм ПЭГ, которые использовались для дериватизации других белков, например моно (C1–C10) алкокси– или арилокси–полиэтиленгликоль или полиэтиленгликоль–малеинимид. Антитело, подлежащее пегилированию, может быть агликозильрованным антителом. Способы пегилирования известны в данной области и могут применяться к антителам по изобретению, как описано, например, в европейских патентах №№ EP 0154316 и EP 0401384 и патенте США № 5824778, содержание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылок

Термины «слитый белок» или «слитый полипептид» относятся к белкам, которые сочетают в себе свойства двух или более отдельных белков. Такие белки имеют, по меньшей мере, два гетерологичных полипептида ковалентно связанных либо непосредственно, либо через аминокислотный линкер. Полипептиды, образующие слитый белок, как правило, связаны C–концом с N–концом, хотя они также могут быть связаны C–концом с C–концом, N–концом с N–концом или N–концом с C–концом. Полипептиды слитого белка могут быть расположены в любом порядке и могут включать более одного или обоих компонентов полипептидов. Термин включает консервативно модифицированные варианты, полиморфные варианты, аллели, мутанты, субпоследовательности, межвидовые гомологи и иммуногенные фрагменты антигенов,

которые образуют слитый белок. Слитые белки по изобретению могут также содержать дополнительные копии компонента антигена или его иммуногенный фрагмент. Слитый белок может содержать один или несколько связывающих доменов, связанных вместе и далее связанных с Fc-доменом, таким как Fc-домен IgG. Слитые белки могут быть дополнительно связаны друг с другом, чтобы имитировать моноклональное антитело и обеспечить шесть или более связывающих доменов. Слитые белки можно получать рекомбинантными способами, известными в данной области. Получение слитых белков известно в данной области и описано, например, в публикации международной патентной заявки №№ WO 1995/027735 A1, WO 2005/103077 A1, WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, WO 2010/078966 A1, публикации патентной заявки США №. US 2015/0125419 A1 и US 2016/0272695 A1, и патенте США № 8921519, содержание каждого из которых включено в настоящий документ в качестве ссылки.

Термин «гетерологичный» при использовании со ссылкой на части нуклеиновой кислоты или белка указывает на то, что нуклеиновая кислота или белок содержит две или более субпоследовательности, которые не встречаются в такой связи по отношению друг к другу в природе. Например, нуклеиновая кислота является, как правило, рекомбинантно произведенной, имеющей два или более последовательностей из неродственных генов, организованных для получения новой функциональной нуклеиновой кислоты, например, промотора из одного источника и кодирующей области из другого источника, или кодирующие области из разных источников. Аналогично, гетерологичный белок указывает на то, что белок содержит две или более субпоследовательности, которые не встречаются в одной и той же взаимосвязи в природе (например, слитый белок).

Термин «консервативные аминокислотные замены» означает модификации аминокислотной последовательности, которые не отменяют связывание антитела или слитого белка с антигеном. Консервативные аминокислотные замены включают замену аминокислоты в одном классе аминокислотой того же класса, где класс определяется общими физико-химическими свойствами боковой цепи аминокислоты и высокими частотами замен в гомологичных белках, обнаруженных в природе, как определено, например, стандартной матрицей частот замен Дайхофа матрицей BLOSUM. Шесть общих классов боковых цепей аминокислот были классифицированы и включают в себя: класс I (Cys); Класс II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); Класс III (Asn, Asp, Gln, Glu); Класс IV (His, Arg, Lys); Класс V (Ile, Leu, Val, Met); и Класс VI (Phe, Tyr, Trp). Например, замена Asp на другой остаток III класса, такой как Asn, Gln или Glu, является консервативной заменой. Таким образом, предсказанный несущественный аминокислотный остаток в антителе предпочтительно заменяется другим аминокислотным остатком из того же класса. Способы выявления аминокислотных консервативных замен, которые не устраняют связывание антигена, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell, et al., *Biochemistry* **1993**, 32, 1180–1187; Kobayashi, et al., *Protein Eng.* **1999**, 12, 879–884 (1999); и Burks, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 412–417.

Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «идентичный на 99%») в отношении два или более нуклеиновые кислоты или полипептиды, относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании (с введением пропусков, если необходимо) для максимального соответствия, без рассмотрения каких-либо консервативных аминокислотных замен как части идентичности последовательностей. Процент идентичности можно измерить с помощью программного обеспечения для сравнения последовательностей или алгоритмов или путем визуального осмотра. В данной области известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для получения выравниваний аминокислот или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, набор программ BLAST, доступный на веб-сайте BLAST у Национального центра биотехнологической информации правительства США. Сравнение между двумя последовательностями можно проводить с использованием алгоритма или BLASTN, или BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновой кислоты, в то время как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или MegAlign, доступные у DNASTAR, представляют собой дополнительное общедоступное программное обеспечение, которое можно использовать для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области может определить подходящие параметры для максимального выравнивания при помощи конкретной программы для выравнивания. В определенных вариантах осуществления используют параметры по умолчанию программы для выравнивания.

Как применяют в настоящем документе, термин «вариант» включает в качестве неограничивающих примеров антители или слитые белки, которые содержат аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности референсного антитела одной или несколькими заменами, делециями и/или добавлениями в определенных положениях в пределах аминокислотной последовательности референсного антитела или примыкающих к аминокислотной последовательности референсного антитела. Вариант может содержать одну или несколько консервативных замен в аминокислотной последовательности по сравнению с аминокислотной последовательностью референсного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену аналогично заряженных или незаряженных аминокислот. Вариант сохраняет способность специфически связываться с антигеном референсного антитела. Термин «вариант» также включает пегилированные антители или белки.

Последовательности нуклеиновой кислоты в подразумеваемой форме включают ее консервативно модифицированные варианты (например, замены вырожденных кодонов) и

комплементарные последовательности, а также явно указанную последовательность. В частности, замена вырожденных кодонов может быть достигнута путем генерации последовательностей, в которых третье положение одного или нескольких выбранных (или всех) кодонов замещено остатками смешанных оснований и/или дезоксинозином. Batzer, et al., *Nucleic Acid Res.* **1991**, 19, 5081; Ohtsuka, et al., *J. Biol. Chem.* **1985** 260 2605–2608; Rossolini, et al., *Mol. Cell. Probes* **1994**, 8, 91–98. Термин «нуклеиновая кислота» применяют взаимозаменяемо для кДНК, мРНК, олигонуклеотида и полинуклеотида.

Термин «биоподобный препарат» означает биологический продукт, включая моноклональное антитело или белок, который имеет высокое сходство с лицензированным в США эталонным биологическим продуктом, несмотря на незначительные различия в клинически неактивных компонентах, и для которого нет клинически значимых различий между биологическим продуктом и эталонным продуктом в отношении безопасности, чистоты и эффективности продукта. Кроме того, подобное биологическое лекарство или «биоподобный препарат» представляет собой биологическое лекарство, похожее на другое биологическое лекарство, которое уже разрешено к применению Европейским агентством по лекарственным средствам. Термин «биоподобный препарат» также используется в виде синонима другими национальными и региональными регулирующими органами. Биологические продукты или биологические лекарства представляют собой лекарства, которые производятся биологическим источником или получены из биологического источника, такого как бактерии или дрожжи. Они могут состоять из относительно низкомолекулярных соединений, таких как человеческий инсулин или эритропоэтин, или сложных молекул, таких как моноклональные антитела. Например, если эталоном белка IL-2 является алдеслейкин (PROLEUKIN), белок, одобренный регулирующими органами по лекарственным средствам со ссылкой на алдеслейкин, является «биоподобным препаратом» для алдеслейкина или представляет собой «его биоподобный препарат». В Европе подобное биологическое лекарство или «биоподобный препарат» представляет собой биологическое лекарство, похожее на другое биологическое лекарство, которое уже было разрешено для использования Европейским агентством по лекарственным средствам (ЕМА). Соответствующей правовой основой для подобных биологических применений в Европе является статья 6 Регламента (ЕС) № 726/2004 и статья 10 (4) Директивы 2001/83/ЕС с поправками и, таким образом, в Европе биоподобный препарат может быть разрешен, одобрен для разрешения или может являться предметом заявки на одобрение в соответствии со Статьей 6 Регламента (ЕС) № 726/2004 и Статьей 10 (4) Директивы 2001/83/ЕС. Уже утвержденный оригинальный биологический лекарственный препарат может быть обозначен как «эталонный лекарственный препарат» в Европе. Некоторые из требований, предъявляемых к продукту, который следует считать биоподобным препаратом, изложены в Руководстве СНМР по аналогичным биологическим лекарственным средствам. Кроме того, ЕМА предоставляет рекомендации по конкретным

продуктам, включая рекомендации, касающиеся биоподобных препаратов моноклональных антител на основе характеристики «продукта по продукту» и публикует на своем веб-сайте. Биоподобный препарат, описанный в настоящем документе, может быть аналогичен эталонному лекарственному средству по качественным характеристикам, биологической активности, механизму действия, профилям безопасности и/или эффективности. Кроме того, биоподобный препарат предназначен для использования или его можно использовать для лечения тех же состояний, что и эталонный лекарственный препарат. Таким образом, считается, что биоподобный препарат, описанный в данном документе, имеет сходные или очень похожие качественные характеристики с эталонным лекарственным средством. Альтернативно, или кроме того, биологическая активность препарата, описанного в настоящем документе, может иметь сходную или очень сходную биологическую активность с эталонным лекарственным средством. Альтернативно, или кроме того, считается, что биоподобный препарат, описанный в настоящем документе, имеет такой же или очень сходный профиль безопасности с эталонным лекарственным средством.

Альтернативно, или кроме того, эффективность биоподобного препарата, описанного в настоящем документе, может иметь аналогичную или очень сходную эффективность с эталонным лекарственным средством. Как описано в настоящем документе, биоподобный препарат в Европе сравнивают с эталонным лекарственным средством, которое было одобрено ЕМА. Однако в некоторых случаях биоподобный препарат можно сравнивать с биологическим лекарственным средством, которое было разрешено за пределами Европейской экономической зоны (не зарегистрированный ЕАОС «препарат сравнения») в некоторых исследованиях. Такие исследования включают, например, определенные клинические и не клинические исследования *in vivo*. Как применяют в настоящем документе, термин «биоподобный препарат» также относится к биологическому лекарственному средству, которое сравнивали или его можно сравнивать с зарегистрированным препаратом сравнения, не входящим в ЕЕА. Определенными биоподобными препаратами являются белки, такие как антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие участки) и слитые белки. Белковый биоподобный препарат может иметь аминокислотную последовательность, которая имеет незначительные модификации в структуре аминокислот (включая, например, делеции, добавления и/или замены аминокислот), которые не оказывают существенного влияния на функцию полипептида. Биоподобный препарат может содержать аминокислотную последовательность, имеющую идентичность последовательности на 97% или более по отношению к аминокислотной последовательности его эталонного лекарственного средства, например, 97%, 98%, 99% или 100%. Биоподобный препарат может содержать одну или несколько посттрансляционных модификаций, например, но не ограничиваясь ими, гликозилирование, окисление, дезамидирование и/или укорочение, которое отличается от посттрансляционных модификаций эталонного лекарственного средства, при условии, что различия не приводят к изменению безопасности и/или эффективности

лекарственного средства. Биоподобный препарат может иметь идентичную схему гликозилирования или схему гликозилирования, отличную от схемы эталонного лекарственного средства. В частности, хотя и не исключительно, биоподобный препарат может иметь другую схему гликозилирования, если различия направлены на решение проблем безопасности, связанных с эталонным лекарственным средством. Кроме того, биоподобный препарат может отличаться от эталонного лекарственного средства, например, по его силе, фармацевтической форме, составу, эксципиентам и/или форме выпуска, не в ущерб обеспечению безопасности и эффективности лекарственного средства. Биоподобный препарат может содержать различия в профилях, например, фармакокинетических (ФК) и/или фармакодинамических (ФД) по сравнению с эталонным лекарственным средством, но считается, что он достаточно схож с эталонным лекарственным средством, чтобы быть разрешенным или считаться подходящим для регистрации. При определенных обстоятельствах биоподобный препарат демонстрирует различные характеристики связывания по сравнению с эталонным лекарственным средством, где различные характеристики связывания, рассматриваемые регулирующим органом, таким как ЕМА, не являются барьером для регистрации в качестве подобного биологического продукта. Термин «биоподобный препарат» также используется как синоним другими национальными и региональными регулирующими органами.

Термин «злокачественные опухоли системы крови» относится к злокачественным опухолям и ракам кроветворных и лимфатических тканей млекопитающих, включая в качестве неограничивающих примеров ткани крови, костного мозга, лимфоузлов и лимфатической системы. Злокачественные опухоли системы крови могут приводить к образованию «опухоли жидких тканей». Злокачественные опухоли системы крови в качестве неограничивающих примеров включают острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфому (МЛ), острый миелолейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМоЛ), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин «В-клеточные злокачественные опухоли системы крови» относится к злокачественным опухолям системы крови, которые поражают В-клетки.

Термин «опухоль жидких тканей» относится к аномальной массе клеток, которая по своей природе является жидкостью. Злокачественные опухоли жидких тканей в качестве неограничивающих примеров включают лейкозы, миеломы и лимфомы, а также другие злокачественные опухоли системы крови. ОИЛ, полученные из опухолей жидких тканей, включая опухоли жидких тканей, находящиеся в костном мозге, в настоящем документе могут также быть обозначены как лимфоциты, инфильтрирующие костный мозг (МЛ). ОИЛ, полученные из опухолей жидких тканей, включая опухоли жидких тканей, циркулирующие в периферической крови, в настоящем документе могут также быть обозначены как PVL. Термины МЛ, ОИЛ, и PVL используются взаимозаменяемо в настоящем документе и различаются только по типу ткани, из которой были получены клетки.

Термин «биопсия» относится к любой медицинской процедуре, которую используют для получения злокачественных клеток, включая биопсию костного мозга.

Термины «острый миелолейкоз» или «ОМЛ» относятся к злокачественным опухолям клеточных линий миелоидного ряда крови, которые также известны в данной области как острый миелогенный лейкоз и острый нелимфоцитарный лейкоз. Хотя ОМЛ представляет собой опухоль жидких тканей, некоторые проявления ОМЛ, включая эксарамедулярные проявления, такие как хлорома, демонстрируют свойства солидной опухоли, но классифицируются в настоящем документе как опухоль жидких тканей.

Как применяют в настоящем документе, термин «микроокружение» может относиться к микроокружению солидной опухоли или опухоли системы крови в целом или к индивидуальной подгруппе клеток внутри микроокружения. Микроокружение опухоли, как применяют в настоящем документе, относится к сложной смеси «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических сигналов, которые способствуют опухолевой трансформации, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, способствуют терапевтической резистентности и обеспечивают ниши для доминирующих метастазов для их благополучного развития», как описано в Swartz, et al., *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, вычищение опухоли иммунной системой происходит редко из-за подавления иммунитета микроокружением.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству соединения или комбинации соединений, как описано в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления предполагаемого применения, включая в качестве неограничивающих примеров, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*), или состояния индивидуума и состояния заболевания, которое лечат (например, масса, возраст и пол индивидуума), тяжести состояния заболевания или способа введения. Термин также относится к дозе, которая будет вызывать определенный ответ в клетках-мишенях (например, снижение адгезии тромбоцитов и/или клеточной миграции). Конкретная доза будет варьировать в зависимости от конкретных выбранных соединений, схемы дозирования, которой необходимо следовать, вводят ли соединение в комбинацию с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую она вводится, и физической системы доставки, в которой переносится соединение.

«Терапевтический эффект» как термин, применяемый в настоящем документе охватывает терапевтическую пользу и/или профилактическую пользу. Профилактический эффект включает в себя задержку или устранение появления заболевания или состояния, задержку или устранение появления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или изменение прогрессирования заболевания или состояния, или любое их сочетание.

Термины «лечение», «лечить» и т. д. относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим в отношении полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или может быть терапевтическим в отношении частичного или полного излечения от заболевания и/или неблагоприятного воздействия, связанного с заболеванием. «Лечение», как применяют в настоящем документе, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает в себя: (а) предотвращение возникновения заболевания у индивидуума, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не был диагностирован как имеющий его; (б) подавление заболевания, то есть прекращение его развития или прогрессирования; и (в) облегчение заболевания, т.е. регрессия заболевания и/или облегчение одного или нескольких симптомов заболевания. «Лечение» также подразумевает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта, даже при отсутствии заболевания или состояния. Например, «лечение» включает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или придавать иммунитет при отсутствии заболевания, например, в случае вакцины.

Термины «QD», «qd» или «q.d.» означают *quaque die*, раз в сутки или раз в день. Термины «BID», «bid» или «b.i.d.» означают *bis in die*, дважды в сутки или два раза в день. Термины «TID», «tid» или «t.i.d.» означают *ter in die*, три раза в сутки, или три раза в день. Термины «QID», «qid» или «q.i.d.» означают *quater in die*, четыре раза в сутки, или четыре раза в день.

Под «опухоль–инфильтрирующими лимфоцитами» или «ОИЛ» в настоящем документе подразумевают популяцию клеток, первоначально полученных в виде лейкоцитов, которые покинули кровотоки индивидуума и мигрировали в опухоль. ОИЛ в качестве неограничивающих примеров включают CD8+цитотоксические Т–клетки (лимфоциты), Th1 и Th17 CD4+Т–клетки, клетки–естественные киллеры, дендритные клетки и M1 макрофаги. ОИЛ включают как первичные, так и вторичные ОИЛ. «Первичные ОИЛ» представляют собой клетки, которые получены из образцов ткани пациента, как указано в настоящем документе (иногда обозначается как «свежесобранные»), а «вторичные ОИЛ» представляют собой любые клеточные популяции ОИЛ, которые были наращены или размножены, как обсуждается в настоящем документе, включая в качестве неограничивающих примеров общую популяцию ОИЛ, размноженные ОИЛ («REP ОИЛ»), а также «geREP ОИЛ», как обсуждается в настоящем документе.

ОИЛ, в основном, можно определять либо биохимически, используя поверхностные клеточные маркеры, либо функционально, по их способности проникать в опухоли и эффекту лечения. ОИЛ можно, в основном, классифицировать по экспрессии одного или нескольких из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD–1 и CD25. Дополнительно и альтернативно, ОИЛ можно функционально определять по их способности проникать в солидные опухоли при

реинтродукции в пациента. Кроме того, ОИЛ могут характеризоваться мощностью – например, ОИЛ могут считаться сильнодействующими, если, например, высвобождение интерферона (ИФН) больше чем приблизительно 50 пг/мл, больше чем приблизительно 100 пг/мл, больше чем приблизительно 150 пг/мл, или больше чем приблизительно 200 пг/мл.

Под «криоконсервированными ОИЛ» (или криоконсервированными МПЛ или РВЛ) в настоящем документе подразумевают, что ОИЛ, либо первичные, общая популяция, либо размноженные (REP ОИЛ), обрабатывают и хранят в диапазоне приблизительно от -150°C до -60°C . Общие способы криоконсервации также описаны в другом месте в настоящем документе, в том числе в Примерах. Для наглядности «криоконсервированные ОИЛ» отличаются от замороженных тканей, образцы которых можно использовать в качестве источника первичных ОИЛ.

Под «оттаявшими криоконсервированными ОИЛ» (или оттаявшими МПЛ или РВЛ) в настоящем документе подразумевают популяцию ОИЛ, которая ранее была криоконсервирована, а затем обработана с целью возврата к комнатной температуре или температуре выше, включая в качестве неограничивающих примеров температуру клеточной культуры или температуры, где ОИЛ можно вводить пациенту.

Под «популяцией клеток» (включая ОИЛ) в данном документе подразумевают ряд клеток, которые имеют общие черты. В основном, численность популяций варьируется от 1×10^6 до 1×10^{10} , при этом разные популяции ОИЛ содержат различное число. Например, первоначальный рост первичных ОИЛ в присутствии ИЛ-2 приводит к общей популяции ОИЛ примерно 1×10^8 клеток. REP размножение, в основном, делают для обеспечения популяции от $1,5 \times 10^9$ до $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

Как правило, ОИЛ первоначально получают из образца опухоли пациента («первичные ОИЛ»), а затем размножают в большую популяцию для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют, повторно стимулируют, как описано в настоящем документе, и необязательно оценивают по фенотипическим и метаболическим показателям, как показатель здоровья ОИЛ.

Как правило, собранную клеточную суспензию называют «первичной популяцией клеток» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

В основном, как обсуждается в настоящем документе, ОИЛ первоначально готовят путем получения первичной популяции ОИЛ из опухоли, удаленной у пациента, как обсуждается в настоящем документе («первичная клеточная популяция» или «первая клеточная популяция»). За этим следует начальное общее размножение при помощи культивирования клеток с ИЛ-2, образование второй популяции клеток (иногда упоминается в документе как «общая популяция ОИЛ» или «вторая популяция»).

Термин «цитотоксический лимфоцит» включает цитотоксические Т-клетки (CTL) (включая CD8+цитотоксические Т-лимфоциты и CD4+Т-хелперные лимфоциты), Т-клетки–естественные киллеры (NKT) и клетки–естественные киллеры (NK). Цитотоксические лимфоциты могут включать, например, например, полученные из

периферической крови $\alpha\beta$ -TCR-положительные или $\gamma\delta$ -TCR-положительные Т-клетки, активированные опухоль-ассоциированными антигенами и/или трансдуцированные специфичными для опухоли рецепторами химерных антигенов или Т-клеточными рецепторами, и могут включать опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ).

Термин «Т-клетка центральной памяти» относится к подмножеству Т-клеток, которые у человека являются CD45RO⁺ и постоянно экспрессируют CCR7 (CCR7^{hi}) и CD62L (CD62^{hi}). Поверхностный фенотип Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для Т-клеток центральной памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BМI. Т-клетки центральной памяти после стимуляции TCR преимущественно секретируют в качестве эффекторных молекул ИЛ-2 и CD40L. Т-клетки центральной памяти преобладают в компартменте CD4 в крови, а у человека пропорционально обогащают лимфоузлы и миндалины.

Термин «Т-клетка эффекторной памяти» относится к подмножеству Т-клеток человека или млекопитающих, которые, как и Т-клетки центральной памяти, являются CD45RO⁺, но утратили постоянную экспрессию CCR7 (CCR7^{lo}) и являются гетерогенными или низкими по экспрессии CD62L (CD62L^{lo}). Поверхностный фенотип Т-клеток эффекторной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для Т-клеток эффекторной памяти включают BLIMP1. Т-клетки эффекторной памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, в том числе интерферон- γ , IL-4 и IL-5. Т-клетки эффекторной памяти преобладают в компартменте CD8 в крови, а у человека ими пропорционально обогащены легкие, печень и кишечник. CD8⁺ Т-клетки эффекторной памяти несут большое количество перфорина.

Термин «закрытая система» относится к системе, которая закрыта для внешней среды. Любая закрытая система, подходящая для клеточной культуры, может использоваться со способами по настоящему изобретению. Закрытые системы включают, например, но не ограничиваются закрытыми G-контейнерами. Как только сегмент опухоли добавляют к закрытой системе, система не открывается внешней среде, пока ОИЛ не будут готовы для введения пациенту.

В некоторых вариантах осуществления способы настоящего изобретения дополнительно включают стадию «pre-REP», на которой опухолевая ткань или клетки из опухолевой ткани выращивают в стандартных лабораторных средах (включая в качестве неограничивающих примеров RPMI) и обрабатывают реагентами, такими как облученные питающие клетки и антитела к CD3 для достижения желаемого эффекта, такого как увеличение количества ОИЛ и/или обогащение популяции клетками, содержащими желаемые поверхностные клеточные маркеры или другие структурные, биохимические или функциональные особенности. Стадия pre-REP может использовать реагенты лабораторного уровня (при условии, что реагенты лабораторного уровня разбавляются на более поздней стадии REP), что упрощает включение альтернативных стратегий для улучшения производства ОИЛ. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления

описанные агонист TLR и/или пептид или пептидомиметики могут быть включены в среду для культивирования во время стадии pre-REP. Культура pre-REP в некоторых вариантах осуществления может включать IL-2. Настоящее изобретение относится в предпочтительных аспектах к новым способам увеличения REP с одним или несколькими дополнительными протоколами повторной стимуляции, также именуемыми в этом документе как «протокол быстрого размножения с повторной стимуляцией» или «geREP», что неожиданно приводит к размножению подгрупп Т-клеток памяти, в том числе к размножению подгрупп Т-клеток эффекторной памяти, и/или к заметному усилению гликолитического дыхания по сравнению со свежесобранными ОИЛ или оттаявшими криоконсервированными ОИЛ для повторно стимулированных ОИЛ (иногда называют в данном документе как «geОИЛ»). То есть, используя процедуру geREP для криоконсервированных ОИЛ, пациенты могут получать высокометаболически активные здоровые ОИЛ, что приводит к более благоприятным результатам.

Когда указывается «противоопухолевое необходимое количество», «ингибирующее опухоль необходимое количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиций по настоящему изобретению, которое должно быть назначено врачом, может быть определено врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массы, размера опухоли, степень инфицирования или метастазирования и состояния пациента (индивидуума). Как правило, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты, описываемые в настоящем документе, можно вводить в дозе от 10^4 до 10^{11} клеток/кг массы тела (например, от 10^5 до 10^6 , от 10^5 до 10^{10} , от 10^5 до 10^{11} , от 10^6 до 10^{10} , от 10^6 до 10^{11} , 10^7 до 10^{11} , от 10^7 до 10^{10} , от 10^8 до 10^{11} , от 10^8 до 10^{10} , от 10^9 до 10^{11} или от 10^9 до 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Композиции с генетически модифицированными цитотоксическими лимфоцитами также можно вводить несколько раз с этими дозировками. Генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты можно вводить с помощью инфузионных методов, которые общеизвестны в иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Специалист в данной области медицины может легко определить оптимальную дозировку и схему лечения для конкретного пациента, проводя мониторинг пациента на наличие признаков заболевания и корректируя лечение таким образом.

Во избежание сомнений, в настоящем документе предполагается, что конкретные признаки (например, целые числа, характеристики, значения, применения, заболевания, формулы, соединения или группы), описанные в сочетании с конкретным аспектом, вариантом осуществления или примером по изобретению, следует понимать как применимые к любому другому аспекту, если они не являются несовместимыми с ним. Таким образом, такие признаки можно использовать при необходимости в сочетании с любым из определений, пунктов формулы или вариантов осуществления, определенных в настоящем документе. Все признаки, раскрытые в этом описании (включая любые

прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и чертежи) и/или все этапы любого раскрытого способа или процесса, можно сочетать в любой комбинации, кроме комбинаций, где по меньшей мере некоторые из признаков и/или этапы являются взаимоисключающими. Изобретение не ограничено какими-либо деталями любых раскрытых вариантов осуществления. Изобретение распространяется на любой новый признак или новую комбинацию признаков, раскрытых в данном описании (включая любые прилагаемые пункты формулы изобретения, реферат и чертежи), или на любой новый этап, или любую новую комбинацию этапов любого описанного способа или процесса.

Термины «приблизительно» и «примерно» означают в пределах статистически значимого диапазона значения. Такой диапазон может быть в пределах порядка величины, например в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, более предпочтительно в пределах 10% и даже более предпочтительно в пределах 5% от заданного значения или диапазона. Допустимое отклонение, охватываемое терминами «приблизительно» или «примерно», зависит от конкретной исследуемой системы и может быть легко оценено специалистом в данной области. Кроме того, термины «приблизительно» и «примерно» означают, что измерения, размеры, состав, параметры, формы и другие величины и характеристики не являются и не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или большими или меньшими, по желанию, с учетом допусков, коэффициентов пересчета, округления, погрешности измерения и т. д., а также других факторов, известных специалистам в данной области. В основном, измерение, размер, состав, параметр, форма или другая величина или характеристика являются «приблизительными» или «примерными», независимо от того, явно ли они указаны в качестве таковых. Отметим, что варианты осуществления самых разных размеров, форм и измерений могут использовать описанные условия.

Переходные термины «содержащий», «состоящий по существу из», «состоящий из», при использовании в прилагаемой формуле изобретения, в оригинальной и измененной форме, определяют объем формулы изобретения в отношении того, какие неотмеченные дополнительные элементы или этапы притязаний, если таковые имеются, исключены из объема формулы изобретения. Термин «содержащий» предназначен для того, чтобы быть включающим или открытым, и не исключает какого-либо дополнительного, неотмеченного элемента, способа, этапа или материала. Термин «состоящий из» исключает любые элементы, этапы или материалы, отличные от указанных в формуле изобретения, и, в последнем случае, примеси, обычно связанные с указанным материалом/материалами. Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем притязаний указанными элементами, этапами или материалами, а также теми, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые характеристики описываемого в заявке изобретения. Все композиции, способы и наборы описанных в настоящем документе, которые воплощают настоящее изобретение, могут, в альтернативных вариантах осуществления, более конкретно определяться любым из

переходных терминов «содержащий», «состоящий по существу из» и «состоящий из».

Варианты осуществления способов размножения терапевтических Т-клеток, включая периферическую кровь (PBL) и/или костный мозг (MIL)

Способы размножения лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови

Способ 1 для PBL. В варианте осуществления изобретения, PBL размножают при помощи способов, описываемых в настоящем документе. В варианте осуществления изобретения, способ включает получение образца PBMC из цельной крови. В варианте осуществления, способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из PBMCs при помощи негативного отбора не-CD19+ фракции. На сутки 0, чистые Т-клетки культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) и IL-2 в концентрации 3000 ME/мл. На сутки 4, к культуре добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 ME/мл. На сутки 7, культуру снова стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), и к культуре добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 ME/мл. PBL собирают на сутки 14, гранулы удаляют, и PBL считают и фенотипируют. В варианте осуществления, способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из PBMCs путем негативного отбора не-CD19+ фракции при помощи магнитных шариков.

В варианте осуществления изобретения, способ 1 для PBL проводят следующим образом: На сутки 0 криоконсервированный образец PBMC оттаивают и подсчитывают PBMC. Т-клетки выделяют с помощью «Human Pan T-Cell Isolation Kit» и колонок LS (Miltenyi Biotec). Выделенные Т-клетки подсчитывают и высевают по 5×10^5 клеток на лунку 24-луночного планшета GRex и совместно культивируют с DynaBeads® (анти-CD3/CD28) в соотношении 1:1 с IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл в общем объеме среды CM2 8 мл на лунку. На сутки 4 среду в каждой лунке заменяют с CM2 на AIM-V со свежим IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл. На сутки 7 размноженные клетки собирают, подсчитывают, затем культивируют при 15×10^6 клеток на флакон в флаконах GRex 10M с IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл и DynaBeads® в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) в общем объеме среды AIM-V 100 мл. На сутки 11 среду заменяют средой CM-4 с добавлением свежего IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл. На сутки 14 DynaBeads® удаляют с помощью магнита DynaMag (DynaMag™-15) и подсчитывают клетки.

В варианте осуществления изобретения, способ 1 для PBL проводят следующим образом: На сутки 0 криоконсервированный образец PBMC оттаивают и подсчитывают PBMC. Т-клетки выделяют с помощью «Human Pan T-Cell Isolation Kit» и колонок LS (Miltenyi Biotec). Выделенные Т-клетки подсчитывают и высевают по 5×10^5 клеток на лунку 24-луночного планшета GRex и совместно культивируют с DynaBeads® (анти-CD3/CD28) в соотношении 1:1 с IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл в общем объеме среды CM2 8 мл на лунку. На сутки 4 среду в каждой лунке заменяют с CM2 на AIM-V со свежим IL-2 с концентрацией 3000 ME/мл. На сутки 7 размноженные клетки собирают,

подсчитывают, затем заново высевают 1×10^6 клеток на лунку в новый 24-луночный планшет GRex с IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл и DynaBeads® в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) в общем объеме среды AIM-V 8 мл. На сутки 11 среду заменяют средой CM-4 с добавлением свежего IL-2 с концентрацией 3000 МЕ/мл. На сутки 14 DynaBeads® удаляют с помощью магнита DynaMag (DynaMag™-15) и подсчитывают клетки.

Способ 2 для PBL. В варианте осуществления изобретения, PBL размножают при помощи способа 2 для PBL, который включает получение образца РВМС из цельной крови. Т-клетки из РВМС обогащают путем инкубирования РВМС в течение, по меньшей мере, трех часов при 37°C, а затем выделения неприкрепившихся клеток. Неприкрепившиеся клетки размножают так же как в способе 1 для PBL, то есть, на сутки 0, неприкрепившиеся клетки культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) и IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 4, в культуру добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, культуру снова стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), и в культуру добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. PBL собирают на сутки 14, гранулы удаляют, и PBL считают и фенотипируют.

В варианте осуществления изобретения, способ 2 для PBL проводят следующим образом: на сутки 0, оттаивают криоконсервированный образец РВМС и высевают клетки РВМС в количестве 6 миллионов клеток на лунку в 6-луночный планшет в среду CM-2, и инкубируют в течение 3 часов при 37 градусах Цельсия. Через 3 часа неприкрепившиеся клетки, которые являются PBL, удаляют и считают. PBL культивируют с анти-CD3/CD28 DynaBeads® в соотношении 1:1 гранулы:клетки, при 1×10^6 клеток на лунку и IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл в общем объеме среды CM-2 7 мл в каждой лунке 24-луночного планшета GRex. На сутки 4, среду в каждой лунке меняют на среду AIM-V и свежий IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, размноженные клетки собирают, считают, затем культивируют в количестве 15×10^6 клеток на флакон во флаконах GRex 10М с IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл и DynaBeads® в соотношении 1:1 (Т-клетки:гранулы) в общем объеме среды AIM-V 100 мл. На сутки 11, среду заменяют на среду CM-4 и дополняют свежим IL-2 (3000 МЕ/мл). На сутки 14, DynaBeads удаляют при помощи DynaMag™ Magnet (DynaMag™-15) и клетки считают.

В варианте осуществления изобретения, способ 2 для PBL проводят следующим образом: на сутки 0, криоконсервированный образец РВМС оттаивают и высевают клетки РВМС в количестве 6 миллионов клеток на лунку в 6-луночный планшет в среду CM-2, и инкубируют в течение 3 часов при 37 градусах Цельсия. Через 3 часа неприкрепившиеся клетки, которые являются PBL, удаляют и считают. PBL культивируют с анти-CD3/CD28 DynaBeads® в соотношении 1:1 гранулы:клетки, при 1×10^6 клеток на лунку и IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл в общем объеме среды CM-2 7 мл в каждой лунке 24-луночного планшета GRex. На сутки 4, среду в каждой лунке меняют на среду AIM-V и свежий IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, размноженные клетки собирают, считают, затем культивируют в количестве 1×10^6 клеток на лунку в новом 24-луночном

планшете GReх с IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл и DynaBeads® в соотношении 1:1 (Т-клетки:гранулы) в общем объеме среды AIM-V 8 мл. На сутки 11, среду заменяют на среду CM-4 и дополняют свежим IL-2 (3000 МЕ/мл). На сутки 14, DynaBeads удаляют при помощи DynaMag™ Magnet (DynaMag™-15) и клетки считают.

Способ 3 для PBL. В варианте осуществления изобретения, PBL размножают при помощи способа 3 для PBL, который включает получение образца РВМС из цельной крови. В-клетки выделяют при помощи отбора CD19+, а Т-клетки выбирают при помощи негативной селекции не-CD19+ фракции в образце РВМС. На сутки 0, Т-клетки и В-клетки совместно культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) и IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 4, в культуру добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, культуру снова стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), и в культуру добавляют дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. PBL собирают на сутки 14, гранулы удаляют, и PBL считают и фенотипируют

В варианте осуществления изобретения, способ 3 для PBL проводят следующим образом: на сутки 0, криоконсервированные РВМС, полученные из периферической крови оттаивают и считают. CD19+ В-клетки сортируют при помощи a CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec). Т-клетки очищают из не-CD19+ клеточной фракции при помощи Human Pan T-cell isolation kit и колонок LS (Miltenyi Biotec). Т-клетки (PBLs) и В-клетки совместно культивируют в различных соотношениях в 24-луночном планшете Grex приблизительно в 8 мл среды CM2 в присутствии IL-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл. Соотношения В-клетки:Т-клетки составляют 0,1:1; 1:1 и 10:1. Совместную культуру Т-клетки/В-клетки стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки). На сутки 4, среду меняют с CM2 на AIM-V и добавляют в культуру дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, клетки собирают и считают, и повторно высеивают на новый 24-луночный планшет Grex с среду AIM-V в диапазоне количества клеток приблизительно от $1,5 \times 10^5$ до приблизительно 4×10^5 клеток на лунку и стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), с дополнительным IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 14, DynaBeads удаляют при помощи DynaMag™ Magnet (DynaMag™-15) и клетки считают.

В варианте осуществления, РВМС выделяют из образца цельной крови. В варианте осуществления, образец РВМС используют в качестве исходного вещества для размножения PBL. В варианте осуществления, образец криоконсервируют перед процессом размножения. В другом варианте осуществления свежий образец используют в качестве исходного вещества для размножения PBL. В варианте осуществления изобретения, Т-клетки выделяют из РВМС при помощи способов, известных в данной области. В варианте осуществления, Т-клетки выделяют при помощи Human Pan T-cell isolation kit и колонок LS. В варианте осуществления изобретения, Т-клетки выделяют из РВМС при помощи отбора с помощью антител известными в данной области способами,

например, негативным отбором по CD19.

В варианте осуществления изобретения, способ проводят в течение приблизительно 7 суток, приблизительно 8 суток, приблизительно 9 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 11 суток, приблизительно 12 суток, приблизительно 13 суток, или приблизительно 14 суток. В другом варианте осуществления способ проводят в течение приблизительно 7 суток. В другом варианте осуществления способ проводят в течение приблизительно 14 суток.

В варианте осуществления изобретения, РВМС культивируют с антителами к CD3/CD28. В варианте осуществления, любой доступный продукт анти-CD3/анти-CD28 подходит для настоящего изобретения. В варианте осуществления изобретения, используемый коммерчески доступный продукт представляет собой DynaBeads[®]. В варианте осуществления, DynaBeads[®] культивируют с РВМС в соотношении 1:1 (гранулы:клетки). В другом варианте осуществления антитела представляют собой DynaBeads[®], которые культивируют с РВМС в соотношении 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, или 5:1 (гранулы:клетки). В варианте осуществления изобретения, этапы культивирования с антителами и/или этап повторной стимуляции клеток антителом проводят в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток, приблизительно от 3 до приблизительно 5 суток, или в течение приблизительно 4 суток. В варианте осуществления изобретения, этап культивирования с антителами проводят в течение периода приблизительно 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, или 6 суток.

В варианте осуществления, образец РВМС культивируют с IL-2. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток, которую используют для размножения РВЛ из РВМС, содержит IL-2 в концентрации, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 200 МЕ/мл, приблизительно 300 МЕ/мл, приблизительно 400 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 500 МЕ/мл, приблизительно 600 МЕ/мл, приблизительно 700 МЕ/мл, приблизительно 800 МЕ/мл, приблизительно 900 МЕ/мл, приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1100 МЕ/мл, приблизительно 1200 МЕ/мл, приблизительно 1300 МЕ/мл, приблизительно 1400 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 1600 МЕ/мл, приблизительно 1700 МЕ/мл, приблизительно 1800 МЕ/мл, приблизительно 1900 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2100 МЕ/мл, приблизительно 2200 МЕ/мл, приблизительно 2300 МЕ/мл, приблизительно 2400 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 2600 МЕ/мл, приблизительно 2700 МЕ/мл, приблизительно 2800 МЕ/мл, приблизительно 2900 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3100 МЕ/мл, приблизительно 3200 МЕ/мл, приблизительно 3300 МЕ/мл, приблизительно 3400 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 3600 МЕ/мл, приблизительно 3700 МЕ/мл, приблизительно 3800 МЕ/мл, приблизительно 3900 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4100 МЕ/мл, приблизительно 4200 МЕ/мл, приблизительно 4300 МЕ/мл, приблизительно 4400 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 4600

МЕ/мл, приблизительно 4700 МЕ/мл, приблизительно 4800 МЕ/мл, приблизительно 4900 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5100 МЕ/мл, приблизительно 5200 МЕ/мл, приблизительно 5300 МЕ/мл, приблизительно 5400 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 5600 МЕ/мл, приблизительно 5700 МЕ/мл, приблизительно 5800 МЕ/мл, приблизительно 5900 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, приблизительно 8000 МЕ/мл, приблизительно 8500 МЕ/мл, приблизительно 9000 МЕ/мл, приблизительно 9500 МЕ/мл, и приблизительно 10000 МЕ/мл.

В варианте осуществления изобретения, начальное число клеток РВМС для способа размножения составляет приблизительно от 25000 до приблизительно 1000000, приблизительно от 30000 до приблизительно 900000, приблизительно от 35000 до приблизительно 850000, приблизительно от 40000 до приблизительно 800000, приблизительно от 45000 до приблизительно 800000, приблизительно от 50000 до приблизительно 750000, приблизительно от 55000 до приблизительно 700000, приблизительно от 60000 до приблизительно 650000, приблизительно от 65000 до приблизительно 600000, приблизительно от 70000 до приблизительно 550000, предпочтительно приблизительно от 75000 до приблизительно 500000, приблизительно от 80000 до приблизительно 450000, приблизительно от 85000 до приблизительно 400000, приблизительно от 90000 до приблизительно 350000, приблизительно от 95000 до приблизительно 300000, приблизительно от 100000 до приблизительно 250000, приблизительно от 105000 до приблизительно 200000, или приблизительно от 110000 до приблизительно 150000. В варианте осуществления изобретения, начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 138000, 140000, 145000, или больше. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 28000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 62000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 338000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 336000.

В варианте осуществления изобретения, клетки выращивают в 24-луночном планшете GRex. В варианте осуществления изобретения, используют сопоставимый планшет с лунками. В варианте осуществления, исходное вещество для размножения составляет приблизительно 5×10^5 Т-клеток на лунку. В варианте осуществления изобретения, вещество составляет 1×10^6 клеток на лунку. В варианте осуществления изобретения, число клеток на лунку достаточно для засеивания лунки и размножения Т-клеток.

В варианте осуществления изобретения, кратность размножения РВЛ составляет приблизительно от 20% до приблизительно 100%, от 25% до приблизительно 95%, от 30% до приблизительно 90%, от 35% до приблизительно 85%, от 40% до приблизительно 80%, от 45% до приблизительно от 75%, от 50% до приблизительно 100%, или от 25% до приблизительно 75%. В варианте осуществления изобретения, кратность размножения

составляет приблизительно 25%. В другом варианте осуществления изобретения, кратность размножения составляет приблизительно 50%. В другом варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 75%.

В варианте осуществления изобретения, дополнительный ПЛ-2 можно добавлять к культуре в одни или несколько суток на всем протяжении способа. В варианте осуществления изобретения, дополнительный ПЛ-2 добавляют на сутки 4. В варианте осуществления изобретения, дополнительный ПЛ-2 добавляют на сутки 7. В варианте осуществления изобретения, дополнительный ПЛ-2 добавляют на сутки 11. В другом варианте осуществления, дополнительный ПЛ-2 добавляют на сутки 4, сутки 7, и/или сутки 11. В варианте осуществления изобретения, среду для культивирования клеток можно менять в одни или несколько суток во время способа культивирования клеток. В варианте осуществления, среду для культивирования клеток меняют на сутки 4, сутки 7, и/или сутки 11 способа. В варианте осуществления изобретения, PBL культивируют с дополнительным ПЛ-2 в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, или 14 суток. В варианте осуществления изобретения, PBL культивируют в течение 3 суток после каждого добавления ПЛ-2.

В варианте осуществления, среду для культивирования клеток меняют, по меньшей мере, один раз во время способа. В варианте осуществления, среду для культивирования клеток меняют в то же время, когда добавляют дополнительный ПЛ-2. В другом варианте осуществления среду для культивирования клеток меняют, по меньшей мере, в одни из суток 1, суток 2, суток 3, суток 4, суток 5, суток 6, суток 7, суток 8, суток 9, суток 10, суток 11, суток 12, суток 13, или суток 14. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток, которую используют на всем протяжении способа, может быть одинаковой или разной. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой СМ-2, СМ-4 или АИМ-V.

В варианте осуществления изобретения, Т-клетки повторно стимулировать антителами к CD3/CD28 на одни или несколько суток на всем протяжении 14-суточного способа размножения. В варианте осуществления, Т-клетки повторно стимулируют на сутки 7. В варианте осуществления, для этапа повторной стимуляции используют флаконы GRex 10M. В варианте осуществления изобретения, используют сопоставимые флаконы.

В варианте осуществления изобретения, DynaBeads[®] удаляют при помощи DynaMag[™] Magnet, клетки считают и анализируют при помощи фенотипических и функциональных анализов, как описано в примерах далее. В варианте осуществления изобретения, антитела отделяют от PBL или МПЛ при помощи способов, известных в данной области. В любых вышеуказанных вариантах осуществления, используют отбор ОИЛ, PBL или МПЛ при помощи магнитных шариков.

В варианте осуществления изобретения, образец РВМС инкубируют в течение периода времени при желаемой температуре, эффективной для выявления не

прикрепившихся клеток. В варианте осуществления изобретения, время инкубации составляет приблизительно 3 часа. В варианте осуществления изобретения, температура составляет приблизительно 37° по Цельсию. Неприкрепившиеся клетки затем размножают при помощи способа, описанного выше.

В варианте осуществления изобретения, РВМС получают от пациента, которого лечили ибрутинибом или другим ИТК или киназным ингибитором, таким как ИТК и ингибиторы киназы, как описано в другом месте в настоящем документе. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК является ковалентным ингибитором ИТК, который ковалентно и необратимо связывается с ИТК. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК является аллостерическим ингибитором ИТК, который связывается с ИТК. В варианте осуществления изобретения, РВМС получены от пациента, который проходил лечение с помощью ибрутиниба или другого ингибитора ИТК, включая ингибитор ИТК, как описано в другом месте в настоящем документе, до получения образца РВМС для использования с любым из указанных выше способов, включая способ 1 для РВЛ, способ 2 для РВЛ или способ 3 для РВЛ. В варианте осуществления изобретения лечение ингибитором ИТК вводили, по меньшей мере, 1 раз, по меньшей мере, 2 раза, или, по меньшей мере, 3 раза или более. В варианте осуществления изобретения, РВЛ, которые размножены от пациентов, предварительно леченных ибрутинибом или другими ингибиторами ИТК, содержат меньше клеток LAG3 +, PD-1 +, чем те, которые размножены от пациентов, предварительно не леченных ибрутинибом или другими ингибиторами ИТК. В варианте осуществления изобретения РВЛ, которые получены от пациентов, предварительно получавших ибрутиниб или другой Ингибитор ИТК, имеют повышенные уровни продукции IFN γ , чем те, которые получены от пациентов, предварительно не получавших ибрутиниб или другой Ингибитор ИТК. В варианте осуществления изобретения, РВЛ, которые размножены от пациентов, предварительно леченных ибрутинибом или другим ингибитором ИТК, имеют повышенную литическую активность при более низком коэффициенте Эффектор: Клетка-мишень, чем те, которые размножены от пациентов, не получавших предварительно ибрутиниб или другой Ингибитор ИТК. В варианте осуществления изобретения пациенты, предварительно получавшие ибрутиниб или другие препараты-ингибиторы, имеют более выраженное кратное размножение по сравнению с нелеченными пациентами.

В варианте осуществления изобретения, способ включает этап добавления ингибитора ИТК к клеточной культуре. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют в одни или несколько суток из суток 0, суток 1, суток 2, суток 3, суток 4, суток 5, суток 6, суток 7, суток 8, суток 9, суток 10, суток 11, суток 12, суток 13, или суток 14 способа. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют на сутки во время способа, когда заменяют среду для культивирования клеток. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют на сутки 0 и когда заменяют среду для культивирования клеток. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют во время способа, когда добавляют IL-2. В варианте осуществления, ингибитор ИТК добавляют на сутки 0, сутки 4, сутки 7, и

необязательно сутки 11 способа. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК добавляют на сутки 0 и на сутки 7 способа. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК является ингибитором, известным в данной области. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК является ингибитором, описанным в настоящем документе.

В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК применяют в способе в концентрации приблизительно от 0,1 нМ до приблизительно 5 мкМ. В варианте осуществления, ингибитор ИТК применяют в способе в концентрации приблизительно 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ, 10 нМ, 20 нМ, 30 нМ, 40 нМ, 50 нМ, 60 нМ, 70 нМ, 80 нМ, 90 нМ, 100 нМ, 150 нМ, 200 нМ, 250 нМ, 300 нМ, 350 нМ, 400 нМ, 450 нМ, 500 нМ, 550 нМ, 600 нМ, 650 нМ, 700 нМ, 750 нМ, 800 нМ, 850 нМ, 900 нМ, 950 нМ, 1 мкМ, 2 мкМ, 3 мкМ, 4 мкМ, или 5 мкМ.

В варианте осуществления изобретения, способ включает этап добавления ингибитора ИТК, когда РВМС получены от пациента, которого ранее не лечили ингибитором ИТК, таким как ибрутиниб.

В некоторых вариантах осуществления образец РВМС получен от индивидуума или пациента, которого предварительно необязательно лечили схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК. В некоторых вариантах осуществления образец опухоли взят от индивидуума или пациента, которого предварительно лечили схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК. В некоторых вариантах осуществления пациенты, которые прошли предварительную терапию схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК, прошли курс лечения в течение, по меньшей мере, 1 месяца, по меньшей мере, 2 месяцев, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 4 месяцев, по меньшей мере, 5 месяцев, или 1 года или более. В другом варианте осуществления РВМС получены от пациента, который в настоящее время находится на схеме лечения ингибитором ИТК, таким же как ибрутиниб.

В некоторых вариантах осуществления образец РВМС получен от индивидуума или пациента, которого предварительно лечили схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК, и который оказался устойчивым к ингибитору киназы или ингибитору ИТК, такому как ибрутиниб.

В некоторых вариантах осуществления образец РВМС получен от индивидуума или пациента, которого предварительно лечили схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК, но которого больше не лечат ингибитором киназы или ингибитором ИТК. В некоторых вариантах осуществления образец РВМС получен от индивидуума или пациента, которого предварительно лечили схемой лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК, но которого больше не лечат ингибитором киназы или ингибитором ИТК и который не получает лечения в течение, по меньшей мере, 1 месяца, по меньшей мере, 2 месяцев, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 4 месяцев, по меньшей мере, 5 месяцев, или 1 года или более. В другом

варианте осуществления РВМС получены от пациента, который ранее получал ингибитор ИТК, но не получает лечения в течение, по меньшей мере, 3 месяцев, по меньшей мере, 6 месяцев, по меньшей мере, 9 месяцев, или, по меньшей мере, 1 года.

В варианте осуществления по изобретению, на сутки 0, клетки выбраны по CD19+ и отсортированы таким образом. В варианте осуществления изобретения, отбор производят при помощи антитело–связывающих гранул. В варианте осуществления изобретения, чистые Т–клетки выделяют на сутки 0 из РВМС. В варианте осуществления изобретения, на сутки 0, CD19+ В–клетки и чистые Т–клетки совместно культивируют с антителами к CD3/CD28 в течение минимум 4 суток. В варианте осуществления изобретения, на сутки 4, ИЛ–2 добавляют к культуре. В варианте осуществления изобретения, на сутки 7, культуру повторно стимулируют антителами к CD3/CD28 и дополнительным ИЛ–2. В варианте осуществления изобретения, на сутки 14, PBL собирают.

В варианте осуществления изобретения, для пациентов, которых предварительно не лечили ибрутинибом или другим препаратом ингибитора ИТК, 10–15 мл лейкоцитарного слоя даст примерно 5×10^9 РВМС, что, в свою очередь, даст примерно $5,5 \times 10^7$ исходного клеточного материала, и примерно 11×10^9 PBL в конце процесса размножения. В варианте осуществления изобретения, приблизительно 54×10^6 РВМС дадут приблизительно 6×10^5 исходного вещества и приблизительно $1,2 \times 10^8$ МПЛ (приблизительно 205–кратное размножение).

В варианте осуществления изобретения, для пациентов, которых предварительно лечили ибрутинибом или другим препаратом ингибитора ИТК, процесс размножения даст приблизительно 20×10^9 PBL. В варианте осуществления изобретения, $40,3 \times 10^6$ РВМС дадут приблизительно $4,7 \times 10^5$ начального клеточного материала, и приблизительно $1,6 \times 10^8$ PBL (приблизительно 338–кратное размножение).

В варианте осуществления изобретения, клиническая доза PBL, подходящих для настоящего изобретения для пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХМЛ) составляет приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 PBL, приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 PBL, приблизительно от $0,12 \times 10^9$ до приблизительно 12×10^9 PBL, приблизительно от $0,15 \times 10^9$ до приблизительно 11×10^9 PBL, приблизительно от $0,2 \times 10^9$ до приблизительно 10×10^9 PBL, приблизительно от $0,3 \times 10^9$ до приблизительно 9×10^9 PBL, приблизительно от $0,4 \times 10^9$ до приблизительно 8×10^9 PBL, приблизительно от $0,5 \times 10^9$ до приблизительно 7×10^9 PBL, приблизительно от $0,6 \times 10^9$ до приблизительно 6×10^9 PBL, приблизительно от $0,7 \times 10^9$ до приблизительно 5×10^9 PBL, приблизительно от $0,8 \times 10^9$ до приблизительно 4×10^9 PBL, приблизительно от $0,9 \times 10^9$ до приблизительно 3×10^9 PBL, или приблизительно от 1×10^9 до приблизительно 2×10^9 PBL.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, РВМС можно получать из образца цельной крови путем афереза, из лейкоцитарного слоя, или любым другим известным в данной области способом для получения РВМС.

Способы размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг, (МПЛ) из РВМС, полученных из костного мозга

Способ 1 для МПЛ. В варианте осуществления изобретения, описан способ размножения МПЛ из РВМС, полученных из костного мозга. В варианте осуществления изобретения, способ проводят в течение 14 суток. В варианте осуществления, способ включает получение РВМС из костного мозга и криоконсервацию РВМС. На сутки 0, РВМС культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) и ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 4, дополнительный ИЛ-2 добавляют в культуру в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, культуру снова стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), и дополнительный ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл добавляют в культуру. МПЛ собирают на сутки 14, гранулы удаляют, и МПЛ необязательно считают и фенотипируют.

В варианте осуществления изобретения, способ 1 для МПЛ проводят следующим образом: на сутки 0 криоконсервированный образец РВМС, полученный из костного мозга, оттаивают и подсчитывают РВМС. РВМС совместно культивируют в 24-луночном планшете GRex в количестве 5×10^5 клеток на лунку с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 приблизительно в 8 мл на лунку среды для культивирования клеток СМ-2 (состоящей из RPMI-1640, человеческой сыворотки АВ, L-глутамин, 2-меркаптоэтанол, гентамицин сульфата, среды AIM-V) в присутствии ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 4, среды для культивирования клеток заменяют на AIM-V с дополнительным ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, считают размноженные МПЛ. Переносят 1×10^6 клеток на лунку в новый 24-луночный планшет GRex и культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 приблизительно в 8 мл на лунку среды AIM-V в присутствии ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 11, среды для культивирования клеток заменяют с AIM-V на СМ-4 (состоящую из среды AIM-V, 2 мМ Glutamax, и 3000МЕ/мл ИЛ2). На сутки 14 DynaBeads® удаляют с помощью магнита DynaMag (DynaMag™-15) и подсчитывают МПЛ.

Способ 2 для МПЛ. В варианте осуществления изобретения, способ проводят в течение 7 суток. В варианте осуществления, способ включает получение РВМС из костного мозга и криоконсервацию РВМС. На сутки 0, РВМС культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 3:1 (гранулы:клетки) и ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. МПЛ собирают на сутки 7, гранулы удаляют, и МПЛ необязательно считают и фенотипируют.

В варианте осуществления изобретения, Способ 2 для МПЛ проводят следующим образом: на сутки 0 криоконсервированный образец РВМС оттаивают и подсчитывают РВМС. РВМС совместно культивируют в 24-луночном планшете GRex в количестве 5×10^5 клеток на лунку с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 приблизительно в 8 мл на лунку среды для культивирования клеток СМ-2 (состоящей из RPMI-1640, человеческой сыворотки АВ, L-глутамин, 2-меркаптоэтанол, гентамицин сульфата, среды AIM-V) в присутствии ИЛ-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, DynaBeads® удаляют при помощи DynaMag Magnet (DynaMag™15) и считают МПЛ.

Способ 3 для МПЛ. В варианте осуществления изобретения, способ включает

получение РВМС из костного мозга. На сутки 0, РВМС выбирают по for CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ и сортируют, и не-CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ клеточную фракцию дробят ультразвуком и добавляют добавляют часть разрушенной ультразвуком клеточной фракции обратно к отобранной клеточной фракции. IL-2 добавляют в клеточную культуру в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 3, РВМС культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки) и IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 4, дополнительный IL-2 добавляют в культуру в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, культуру снова стимулируют антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 (гранулы:клетки), и дополнительный IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл добавляют в культуру. На сутки 11, IL-2 добавляют в культуру в концентрации 3000 МЕ/мл. МПЛ собирают На сутки 14, гранулы удаляют, и МПЛs необязательно считают и фенотипируют.

В варианте осуществления изобретения, способ 3 для МПЛ проводят следующим образом: на сутки 0 криоконсервированный образец РВМС оттаивают и подсчитывают РВМС. Клетки окрашивают антителами к CD3, CD33, CD20, и CD14 и сортируют при помощи a S3e Cell sorted (Bio-Rad). Клетки сортируют на две фракции – и фракцию иммунных клеток (или фракцию МПЛ) (CD3+CD33+CD20+CD14+) и ОМЛ-бластную клеточную фракцию (не-CD3+CD33+CD20+CD14+). Ряд клеток из ОМЛ-бластной клеточной фракции, которая приблизительно равна по величине фракции иммунных клеток (или фракции МПЛ), для высаживания в 24-луночный планшет Grex суспендируют в 100 мкл среды и обрабатывают ультразвуком. В этом примере, берут приблизительно от $2,8 \times 10^4$ до приблизительно $3,38 \times 10^5$ клеток из ОМЛ-бластной клеточной фракции и суспендируют в 100 мкл среды CM2, а затем обрабатывают ультразвуком в течение 30 секунд. 100 мкл обработанной ультразвуком ОМЛ-бластной клеточной фракции добавляют к фракции иммунных клеток в 24-луночный планшет Grex. Иммунные клетки присутствуют в количестве приблизительно от $2,8 \times 10^4$ до приблизительно $3,38 \times 10^5$ клеток на лунку приблизительно в 8 мл на лунку среды для культивирования клеток CM-2 в присутствии IL-2 в концентрации 6000МЕ/мл и культивируют с частью ОМЛ-бластной клеточной фракции в течение приблизительно 3 суток. На сутки 3, добавляют антитела к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 к каждой лунке и культивируют приблизительно 1 сутки. На сутки 4, среды для культивирования клеток заменяют на AIM-V с дополнительным IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 7, размноженные МПЛ считают. Приблизительно от $1,5 \times 10^5$ до 4×10^5 клеток на лунку переносят в новый 24-луночный планшет Grex и культивируют с антителами к CD3/CD28 (DynaBeads®) в соотношении 1:1 приблизительно в 8 мл на лунку среды AIM-V в присутствии IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл. На сутки 11, среды для культивирования клеток заменяют с AIM-V на CM-4 (дополненной IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл). На сутки 14, DynaBeads® удаляют при помощи DynaMag Magnet (DynaMag™15) и МПЛ необязательно считают.

В варианте осуществления изобретения, РВМС получены из костного мозга. В

варианте осуществления, РВМС получены из костного мозга путем афереза, аспирации, биопсии иглой, или другими аналогичными способами, известными в данной области. В варианте осуществления, РВМС являются свежими. В другом варианте осуществления РВМС являются криоконсервированными.

В варианте осуществления изобретения, способ проводят в течение приблизительно 7 суток, приблизительно 8 суток, приблизительно 9 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 11 суток, приблизительно 12 суток, приблизительно 13 суток, или приблизительно 14 суток. В другом варианте осуществления способ проводят в течение приблизительно 7 суток. В другом варианте осуществления способ проводят в течение приблизительно 14 суток.

В варианте осуществления изобретения, РВМС культивируют с антителами к CD3/CD28. В варианте осуществления, любой доступный продукт анти-CD3/анти-CD28 подходит для настоящего изобретения. В варианте осуществления изобретения, используемый коммерчески доступный продукт представляет собой DynaBeads[®]. В варианте осуществления, DynaBeads[®] культивируют с РВМС в соотношении 1:1 (гранулы:клетки). В другом варианте осуществления антитела are DynaBeads[®] культивируют с РВМС в соотношении 1,5:1, 2:1, 2,5:1, 3:1, 3,5:1, 4:1, 4,5:1, или 5:1 (гранулы:клетки). В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, используют селекцию на основе магнитных шариков для фракции иммунных клеток (или фракции МЛ) (CD3+CD33+CD20+CD14+) или ОМЛ-бластной клеточной фракции (не-CD3+CD33+CD20+CD14+). В варианте осуществления изобретения, этапы культивирования с антителами и/или этап повторной стимуляции клеток антителом проводят в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток, приблизительно от 3 до приблизительно 5 суток, или в течение приблизительно 4 суток. В варианте осуществления изобретения, этап культивирования с антителами проводят в течение периода приблизительно 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, или 6 суток.

В варианте осуществления изобретения, соотношение числа клеток из ОМЛ-бластной клеточной фракции к числу клеток из фракции иммунных клеток (или Фракции МЛ) составляет приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1. В другом варианте осуществления соотношение составляет приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 5:1, приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 2:1, или приблизительно 1:1. В варианте осуществления изобретения, ОМЛ-бластную клеточную фракцию необязательно разрушают для предотвращения агрегации клеток. В варианте осуществления, ОМЛ-бластную клеточную фракцию разрушают при помощи ультразвука, гомогенизации, клеточного лизиса, вортексирования или вибрации. В другом варианте осуществления ОМЛ-бластную клеточную фракцию разрушают при помощи ультразвука. В варианте осуществления изобретения, не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ клеточную фракцию (ОМЛ-бластную фракцию) лизируют при помощи подходящего способа лизиса, включая высокотемпературный лизис, химический лизис (такой как при помощи органических спиртов), ферментативный лизис и другие способы лизиса клеток,

известные в данной области.

В варианте осуществления изобретения, клетки ОМЛ–бластной клеточной фракции суспендируют при концентрации приблизительно от $0,2 \times 10^5$ до приблизительно 2×10^5 клеток на 100 мкл и добавляют к клеточной культуре с фракцией иммунных клеток. В другом варианте осуществления концентрация составляет приблизительно от $0,5 \times 10^5$ до приблизительно 2×10^5 клеток на 100 мкл, приблизительно от $0,7 \times 10^5$ до приблизительно 2×10^5 клеток на 100 мкл, приблизительно от 1×10^5 до приблизительно 2×10^5 клеток на 100 мкл, или приблизительно от $1,5 \times 10^5$ до приблизительно 2×10^5 клеток на 100 мкл.

В варианте осуществления, образец РВМС культивируют с IL–2. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток, применяемая для размножения МПЛ, содержит IL–2 в концентрации, выбранной из группы, состоящей из приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 200 МЕ/мл, приблизительно 300 МЕ/мл, приблизительно 400 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 500 МЕ/мл, приблизительно 600 МЕ/мл, приблизительно 700 МЕ/мл, приблизительно 800 МЕ/мл, приблизительно 900 МЕ/мл, приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1100 МЕ/мл, приблизительно 1200 МЕ/мл, приблизительно 1300 МЕ/мл, приблизительно 1400 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 1600 МЕ/мл, приблизительно 1700 МЕ/мл, приблизительно 1800 МЕ/мл, приблизительно 1900 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2100 МЕ/мл, приблизительно 2200 МЕ/мл, приблизительно 2300 МЕ/мл, приблизительно 2400 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 2600 МЕ/мл, приблизительно 2700 МЕ/мл, приблизительно 2800 МЕ/мл, приблизительно 2900 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3100 МЕ/мл, приблизительно 3200 МЕ/мл, приблизительно 3300 МЕ/мл, приблизительно 3400 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 3600 МЕ/мл, приблизительно 3700 МЕ/мл, приблизительно 3800 МЕ/мл, приблизительно 3900 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4100 МЕ/мл, приблизительно 4200 МЕ/мл, приблизительно 4300 МЕ/мл, приблизительно 4400 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 4600 МЕ/мл, приблизительно 4700 МЕ/мл, приблизительно 4800 МЕ/мл, приблизительно 4900 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5100 МЕ/мл, приблизительно 5200 МЕ/мл, приблизительно 5300 МЕ/мл, приблизительно 5400 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 5600 МЕ/мл, приблизительно 5700 МЕ/мл, приблизительно 5800 МЕ/мл, приблизительно 5900 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, приблизительно 8000 МЕ/мл, приблизительно 8500 МЕ/мл, приблизительно 9000 МЕ/мл, приблизительно 9500 МЕ/мл, и приблизительно 10000 МЕ/мл.

В варианте осуществления изобретения, дополнительный IL–2 можно добавлять к культуре в одни или несколько суток на всем протяжении способа. В варианте осуществления изобретения, дополнительный IL–2 добавляют на сутки 4. В варианте осуществления изобретения, дополнительный IL–2 добавляют на сутки 7. В варианте

осуществления изобретения, дополнительный ПЛ–2 добавляют на сутки 11. В другом варианте осуществления дополнительный ПЛ–2 добавляют на сутки 4, сутки 7 и/или сутки 11. В варианте осуществления изобретения, МПЛ культивируют с дополнительным ПЛ–2 в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, 7 суток, 8 суток, 9 суток, 10 суток, 11 суток, 12 суток, 13 суток, или 14 суток. В варианте осуществления изобретения, МПЛ культивируют в течение 3 суток после каждого добавления ПЛ–2.

В варианте осуществления, среду для культивирования клеток меняют, по меньшей мере, один раз во время способа. В варианте осуществления, среду для культивирования клеток меняют в то же время, когда добавляют дополнительный ПЛ–2. В другом варианте осуществления среду для культивирования клеток меняют, по меньшей мере, в одни из суток 1, суток 2, суток 3, суток 4, суток 5, суток 6, суток 7, суток 8, суток 9, суток 10, суток 11, суток 12, суток 13, или суток 14. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток, которую используют на всем протяжении способа, может быть одинаковой или разной. В варианте осуществления изобретения, среда для культивирования клеток представляет собой СМ–2, СМ–4 или АИМ–V. В варианте осуществления изобретения, этап замены среды для культивирования клеток на сутки 11 является необязательным. В варианте осуществления изобретения, начальное число клеток РВМС для способа размножения составляет приблизительно от 25000 до приблизительно 1000000, приблизительно от 30000 до приблизительно 900000, приблизительно от 35000 до приблизительно 850000, приблизительно от 40000 до приблизительно 800000, приблизительно от 45000 до приблизительно 800000, приблизительно от 50000 до приблизительно 750000, приблизительно от 55000 до приблизительно 700000, приблизительно от 60000 до приблизительно 650000, приблизительно от 65000 до приблизительно 600000, приблизительно от 70000 до приблизительно 550000, предпочтительно приблизительно от 75000 до приблизительно 500000, приблизительно от 80000 до приблизительно 450000, приблизительно от 85000 до приблизительно 400000, приблизительно от 90000 до приблизительно 350000, приблизительно от 95000 до приблизительно 300000, приблизительно от 100000 до приблизительно 250000, приблизительно от 105000 до приблизительно 200000, или приблизительно от 110000 до приблизительно 150000. В варианте осуществления изобретения, начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 138000, 140000, 145000, или больше. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 28000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 62000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 338000. В другом варианте осуществления начальное число клеток РВМС составляет приблизительно 336000.

В варианте осуществления изобретения, кратность размножения МПЛ составляет приблизительно от 20% до приблизительно 100%, от 25% до приблизительно 95%, от 30% до приблизительно 90%, от 35% до приблизительно 85%, от 40% до приблизительно 80%, от 45% до приблизительно 75%, от 50% до приблизительно 100%, или от 25% до

приблизительно 75%. В варианте осуществления изобретения, кратность размножения составляет приблизительно 25%. В другом варианте осуществления изобретения, кратность размножения составляет приблизительно 50%. В другом варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 75%.

В варианте осуществления изобретения, МПЛs размножают из 10–50 мл аспирата костного мозга. В варианте осуществления изобретения, 10 мл аспирата костного мозга получают от пациента. В другом варианте осуществления 20 мл аспирата костного мозга получают от пациента. В другом варианте осуществления 30 мл аспирата костного мозга получают от пациента. В другом варианте осуществления 40 мл аспирата костного мозга получают от пациента. В другом варианте осуществления 50 мл аспирата костного мозга получают от пациента.

В варианте осуществления изобретения, число РВМС, полученных приблизительно из 10–50 мл аспирата костного мозга, составляет приблизительно 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 РВМС. В другом варианте осуществления число полученных РВМС составляет приблизительно 7×10^7 РВМС.

В варианте осуществления изобретения, приблизительно от 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 РВМС дают приблизительно от $0,5 \times 10^6$ до приблизительно $1,5 \times 10^6$ начального клеточного материала для размножения. В варианте осуществления изобретения, получают приблизительно 1×10^6 начального клеточного материала для размножения.

В варианте осуществления изобретения, общее число МПЛ, собранных в конце периода размножения, составляет приблизительно от $0,01 \times 10^9$ до приблизительно 1×10^9 , приблизительно от $0,05 \times 10^9$ до приблизительно $0,9 \times 10^9$, приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно $0,85 \times 10^9$, приблизительно от $0,15 \times 10^9$ до приблизительно $0,7 \times 10^9$, приблизительно от $0,2 \times 10^9$ до приблизительно $0,65 \times 10^9$, приблизительно от $0,25 \times 10^9$ до приблизительно $0,6 \times 10^9$, приблизительно от $0,3 \times 10^9$ до приблизительно $0,55 \times 10^9$, приблизительно от $0,35 \times 10^9$ до приблизительно $0,5 \times 10^9$, или приблизительно от $0,4 \times 10^9$ до приблизительно $0,45 \times 10^9$.

В варианте осуществления изобретения, 12×10^6 РВМС, полученные из аспирата костного мозга, дают приблизительно $1,4 \times 10^5$ начального клеточного материала, который дает приблизительно $1,1 \times 10^7$ МПЛ к концу способа размножения.

В варианте осуществления изобретения, МПЛ, размноженные из РВМС костного мозга при помощи способа 3 для МПЛ, описанного выше, содержат высокую долю CD8+ клеток и низкое число LAG3+ и PD1+ клеток по сравнению с МПЛ, размноженными при помощи способа 1 для МПЛ или способа 2 для МПЛ. В варианте осуществления изобретения, РВЛ, размноженные из РВМС крови при помощи способа 3 для МПЛ, описанного выше, содержат высокую долю CD8+ клеток и повышенные уровни выработки IFN γ по сравнению с РВЛ, размноженными при помощи способа 1 для МПЛ или способа 2 для МПЛ.

В варианте осуществления изобретения, клиническая доза МПЛ, подходящая для

пациентов с острым миелолейкозом (ОМЛ), находится в диапазоне приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ МП. В другом варианте осуществления число МП, предоставляемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $9,5 \times 10^8$ МП. В другом варианте осуществления число МП, предоставляемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $4,1 \times 10^8$. В другом варианте осуществления число МП, предоставляемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $2,2 \times 10^9$.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, РВМС можно получать из образца цельной крови, из костного мозга, путем афереза, из лейкоцитарного слоя, или любым другим известным в данной области способом для получения РВМС.

Способы для размножения ОИЛ при помощи «Способа 2А»

В варианте осуществления настоящего изобретения, изобретение относится к устройствам и способам для размножения Т-клеток, полученных из костного мозга и/или периферической крови. В варианте осуществления изобретения, Т-клетки имеют повышенную специфичность к опухоли из микроокружения костного мозга в поликлональной, но высоко опухолеспецифичной манере. В варианте осуществления используют микроокружение костного мозга для поддержания и размножения Т-клеток. В варианте осуществления изобретения, размножение ОИЛ примерно в 25–100 раз происходит в процессе размножения в течение 7 или 14 дней. В варианте осуществления, кратность размножения ОИЛ составляет приблизительно 30–90 раз. В варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 35–85 раз. В варианте осуществления, кратность размножения составляет приблизительно 40–80 раз. В варианте осуществления, кратность размножения составляет приблизительно 45–75 раз. В другом варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 40–70 раз. В другом варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 45–65 раз. В другом варианте осуществления кратность размножения составляет приблизительно 25 раз, приблизительно 30 раз, приблизительно 35 раз, приблизительно 40 раз, приблизительно 45 раз и приблизительно 50 раз, приблизительно 55 раз, приблизительно в 60 раз, приблизительно 65 раз приблизительно 70 раз, приблизительно 75 раз, приблизительно 80 раз, приблизительно 85 раз, приблизительно в 85 раз, приблизительно 90 раз, приблизительно 95 раз или приблизительно 100 раз.

В варианте осуществления изобретения, процесс производства Т-клеток не требует какого-либо вмешательства для выбора специфичности опухоли. В варианте осуществления изобретения, способ производства Т-клеток не требует наличия опухоли в костном мозге и/или периферической крови во время размножения Т-клеток. В варианте осуществления, Т-клетки размножены в присутствии почти полного костного мозга.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу выделения Т-клеток из костного мозга и/или периферической крови, как описано в примерах, и в частности, Примере 21, изложенном в WO2010/062742, включенном в настоящий документ в виде ссылки. В варианте осуществления, изобретение относится к способу выделения Т-клеток

из костного мозга и/или периферической крови, как описано, например, в Noonan, et al., 2005, *Cancer Res.* 65:2026–2034, включенном в настоящий документ в виде ссылки.

В варианте осуществления, способы получения костного мозга и/или периферической крови, которые известны специалистам в данной области, подходят для настоящего изобретения. В варианте осуществления изобретения, костный мозг и/или периферическую кровь получают при помощи аспирации иглой. В варианте осуществления изобретения, костный мозг от пациента выкачивают в гепаринсодержащие шприцы и хранят в течение ночи при комнатной температуре. В варианте осуществления изобретения, после хранения содержимое шприцев объединяется в стерильном контейнере и проверяется на качество. Костный мозг обогащают моноклеарными клетками (MNC) при помощи среды для разделения лимфоцитов (LSM) и центрифугирования с помощью COBE Spectra. Клетки в градиенте собирают до эритроцитов и отмывают при помощи HBSS. MNC криоконсервируют при помощи криопротектора на основе гидроксипропилкрахмала, дополненного 2% HSA и 5% DMSO, оставляя некоторое количество MNC для контроля качества. Флакон QC размораживают для определения содержания CD3⁺ и CD38⁺/138⁺ клеток в продукте MNC. Важно отметить, что сбор костного мозга не является ограничением для настоящего изобретения.

В варианте осуществления изобретения, костный мозг выкачивают и фракционируют на градиенте плотности среды для разделения лимфоцитов, и собирают клетки почти до уровня осадка красных клеток. В варианте осуществления, этот способ фракционирования по существу удаляет эритроциты и нейтрофилы, обеспечивая почти полный костный мозг. В варианте осуществления материалом фракционирования представляет собой T-клетки и опухолевые клетки. В варианте осуществления изобретения, способы можно практиковать без специфического этапа разделения T-клеток, и без разделения опухолевых клеток, например, без маркировки T-клеток антителами или другими специфичными для типа клеток детектируемыми метками и без сортировки при помощи активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS).

В варианте осуществления изобретения, полученный костный мозг разделяют в градиенте Фиколл или периферическую кровь суспендируют в бессывороточных условиях в количестве 1×10^6 клеток/мл в среде AIM-V по 200 мкл/лунку.

В варианте осуществления изобретения, костный мозг собирают у индивидуума, который не достиг полной ремиссии. В варианте осуществления изобретения, собирают у индивидуума, который достиг полной ремиссии.

В варианте осуществления изобретения, костный мозг можно получать и замораживать. В варианте осуществления, костный мозг можно получать и сразу же использовать для получения T-клеток.

В дополнительных вариантах осуществления и в соответствии с любыми из вышеизложенных, изобретение относится к способу размножения ОИЛ, способу, включающему контакт популяции ОИЛ, содержащей, по меньшей мере, один ОИЛ, полученный из опухоли жидких тканей. Все обсуждения размножения ОИЛ в настоящем

документе применимы к размножению ОИЛ, полученных из костного мозга, периферической крови, и/или злокачественной опухоли системы крови, включая опухоль жидких тканей.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу получения популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) из опухоли, способу, включающему этапы:

(а) контакта фрагментированной опухоли с первой средой для культивирования клеток;

(b) проведения начального размножения (pre-REP) первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 5 раз больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(с) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ, через 7 суток от начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови (PBMCs); и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(d) сбор третьей популяции ОИЛ; и

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу размножения популяции ОИЛ, включающему способ первого пред-быстрого размножения (pre-REP), а затем способ второго размножения (который может быть способом быстрого размножения – REP), где среда для культивирования клеток, используемая для размножения, содержит IL-2 в концентрации, выбранной из группы, состоящей из концентраций от 100 МЕ/мл до 10000 МЕ/мл, от 200 МЕ/мл до 5000 МЕ/мл, от 300 МЕ/мл до 4800 МЕ/мл, от 400 МЕ/мл до 4600 МЕ/мл, от 500 МЕ/мл до 4400 МЕ/мл, от 600 МЕ/мл до 4200 МЕ/мл, от 700 МЕ/мл до 4000 МЕ/мл, от 800 МЕ/мл до 3800 МЕ/мл, от 900 МЕ/мл до 3600 МЕ/мл, от 1000 МЕ/мл до 3400 МЕ/мл, от 1100 МЕ/мл до 3200 МЕ/мл, от 1200 МЕ/мл до 3000 МЕ/мл, от 1300 МЕ/мл до 2800 МЕ/мл, от 1400 МЕ/мл до 2600 МЕ/мл, от 1500 МЕ/мл до 2400 МЕ/мл, от 1600 МЕ/мл до 2200 МЕ/мл, от 1700 МЕ/мл до 2000 МЕ/мл, от 5500 МЕ/мл до 9500 МЕ/мл, от 6000 МЕ/мл до 9000 МЕ/мл, от 6500 МЕ/мл до 8500 МЕ/мл, от 7000 МЕ/мл до 8000 МЕ/мл, и от 7500 МЕ/мл до 8000 МЕ/мл.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу размножения популяции ОИЛ, включающему способ пред-быстрого размножения (pre-REP) и способ быстрого размножения (REP), где среда для культивирования клеток, используемая для размножения, содержит IL-2 в концентрации, выбранной из группы, состоящей из концентраций приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 200 МЕ/мл, приблизительно

300 МЕ/мл, приблизительно 400 МЕ/мл, приблизительно 100 МЕ/мл, приблизительно 500 МЕ/мл, приблизительно 600 МЕ/мл, приблизительно 700 МЕ/мл, приблизительно 800 МЕ/мл, приблизительно 900 МЕ/мл, приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1100 МЕ/мл, приблизительно 1200 МЕ/мл, приблизительно 1300 МЕ/мл, приблизительно 1400 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 1600 МЕ/мл, приблизительно 1700 МЕ/мл, приблизительно 1800 МЕ/мл, приблизительно 1900 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2100 МЕ/мл, приблизительно 2200 МЕ/мл, приблизительно 2300 МЕ/мл, приблизительно 2400 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 2600 МЕ/мл, приблизительно 2700 МЕ/мл, приблизительно 2800 МЕ/мл, приблизительно 2900 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3100 МЕ/мл, приблизительно 3200 МЕ/мл, приблизительно 3300 МЕ/мл, приблизительно 3400 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 3600 МЕ/мл, приблизительно 3700 МЕ/мл, приблизительно 3800 МЕ/мл, приблизительно 3900 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4100 МЕ/мл, приблизительно 4200 МЕ/мл, приблизительно 4300 МЕ/мл, приблизительно 4400 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 4600 МЕ/мл, приблизительно 4700 МЕ/мл, приблизительно 4800 МЕ/мл, приблизительно 4900 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5100 МЕ/мл, приблизительно 5200 МЕ/мл, приблизительно 5300 МЕ/мл, приблизительно 5400 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 5600 МЕ/мл, приблизительно 5700 МЕ/мл, приблизительно 5800 МЕ/мл, приблизительно 5900 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, приблизительно 8000 МЕ/мл, приблизительно 8500 МЕ/мл, приблизительно 9000 МЕ/мл, приблизительно 9500 МЕ/мл, и приблизительно 10000 МЕ/мл.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу размножения популяции ОИЛ, включающему способ пред-быстрого размножения (pre-REP). В варианте осуществления, изобретение относится к способу размножения pre-REP для популяции ОИЛ, способу pre-REP, включающему этапы контакта популяции ОИЛ, полученной из опухоли жидких тканей, со средой для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл.

В варианте осуществления изобретение относится к способу pre-REP для размножения популяции ОИЛ, способу pre-REP, включающему этапы контакта популяции ОИЛ, полученной из опухоли жидких тканей, со средой для культивирования клеток, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл.

В варианте осуществления, REP можно проводить в газопроницаемом контейнере с использованием ОИЛ, полученных из опухоли жидких тканей в соответствии с настоящим изобретением при помощи любого подходящего способа. Например, ОИЛ можно быстро размножить при помощи неспецифической стимуляции T-клеточного рецептора в

присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). Неспецифический стимул T-клеточного рецептора может включать, например, приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, мышинового моноклонального антитела к CD3 (коммерчески доступно у Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA). ОИЛ можно быстро размножить после стимуляции ОИЛ *in vitro* одним или несколькими антигенами злокачественной опухоли, включая их антигенные части, такие как эпитоп(-ы), которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, такие как связывающий пептид лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27L) или gp100:209-217 (210M), необязательно в присутствии T-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, антиген тирозиназы злокачественной опухоли, MAGE-A3, SSX-2, и VEGFR2, или их антигенные части. ОИЛ можно также быстро размножить путем повторной стимуляции тем же антигеном/антигенами злокачественной опухоли, представленном на HLA-A2-экспрессирующих антиген-презентирующих клетках. Альтернативно, ОИЛ можно дополнительно повторно стимулировать, например, примированными облученными аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2.

В варианте осуществления, способ размножения ОИЛ может включать использование приблизительно от 5000 мл до приблизительно 25000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 5000 мл до приблизительно 10000 мл среды для культивирования клеток, или приблизительно от 5800 мл до приблизительно 8700 мл среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, способ размножения ОИЛ может включать использование приблизительно от 1000 мл до приблизительно 2000 мл клеточной среды, приблизительно от 2000 мл до приблизительно 3000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 3000 мл до приблизительно 4000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 4000 мл до приблизительно 5000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 5000 мл до приблизительно 6000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 6000 мл до приблизительно 7000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 7000 мл до приблизительно 8000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 8000 мл до приблизительно 9000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 9000 мл до приблизительно 10000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 10000 мл до приблизительно 15000 мл среды для культивирования клеток, приблизительно от 15000 мл до приблизительно 20000 мл среды для культивирования клеток, или приблизительно от 20000 мл до приблизительно 25000 мл среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, при размножении ОИЛ используют не более, чем один тип среды для культивирования клеток. Можно использовать любую подходящую среду для культивирования клеток, например, клеточную среду AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфат, и 10 мкМ гентамицина сульфат) (Invitrogen, Carlsbad CA). В отношении этого, способы по изобретению выгодно уменьшают

количество среды и число типов среды, необходимых для увеличения числа ОИЛ. В варианте осуществления, увеличение числа ОИЛ може включать питающие клетки не чаще, чем каждые третьи или четвертые сутки. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для увеличения числа клеток за счет снижения частоты питания, необходимой для размножения клеток.

В варианте осуществления, второе размножение проводят при помощи газопроницаемого контейнера. Такие варианты осуществления позволяют клеточным популяциям размножаться приблизительно от 5×10^5 клеток/см² до диапазона от 10×10^6 и 30×10^6 клеток/см². В варианте осуществления, это размножение происходит без питания. В варианте осуществления, это размножение происходит без питания при условии, что среда располагается на высоте приблизительно 10 см в газонепроницаемом флаконе. В варианте осуществления размножение происходит без питания, но с добавлением одного или нескольких цитокинов. В варианте осуществления, цитокин можно добавлять в виде болюса без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области, используются для размножения ОИЛ, и включают описанные в публикации патентной заявки США №. US 2014/0377739 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2014/210036 A1, публикация патентной заявки США №. US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации патентной заявки США №. US 2011/0136228 A1, патенте США № 8809050, публикации международной патентной заявки № WO 2011/072088 A2, публикации патентной заявки США №. US 2016/0208216 A1, публикации патентной заявки США №. US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2012/129201 A1, публикации патентной заявки США №. US 2013/0102075 A1, патенте США № 8956860, публикации международной патентной заявки № WO 2013/173835 A1, и публикации патентной заявки США №. US 2015/0175966 A1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылки. Такие способы также описаны в Jin, et al., *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283–292, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G–Rex 10 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 10 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 40 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер обеспечивает от 100 до 300 миллионов ОИЛ после двух замен среды.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G–Rex 100 (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 100 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 450 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления,

газопроницаемый контейнер обеспечивает от 1 до 3 миллиардов ОИЛ после двух замен среды.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 100M (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 100 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 1000 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер обеспечивает от 1 до 3 миллиардов ОИЛ без замены среды.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой флакон G-Rex 100L (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 100 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает 2000 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер обеспечивает от 1 до 3 миллиардов ОИЛ без замены среды.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой 24-луночный планшет G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает планшет с лунками, где каждая лунка включает 2 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает планшет с лунками, где каждая лунка включает 8 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер обеспечивает от 20 до 60 миллионов клеток на лунку после двух замен среды.

В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер представляет собой 6-луночный планшет G-Rex (Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает планшет с лунками, где каждая лунка включает 10 см² газопроницаемой поверхности культуры. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер включает планшет с лунками, где каждая лунка включает 40 мл емкости для среды для культивирования клеток. В варианте осуществления, газопроницаемый контейнер обеспечивает от 100 до 300 миллионов клеток на лунку после двух замен среды.

В варианте осуществления, клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной клеточной среды может упростить процедуры, необходимые для размножения клеток. В варианте осуществления, в клеточной среде в первом и/или втором газопроницаемом контейнере отсутствует бета-меркаптоэтанол (BME).

В варианте осуществления, длительность способа, включающего получение образца опухолевой ткани от млекопитающего, культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере с клеточной средой, получение ОИЛ из образца опухолевой ткани, размножение ОИЛ во втором газопроницаемом контейнере с клеточной средой составляет приблизительно от 14 до приблизительно 42 суток,

например, приблизительно 28 суток.

В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл, или 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела ОКТ-3. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ-3.

В варианте осуществления, ОИЛ размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры были использованы для размножения ОИЛ с использованием РВМС при помощи способов, композиций и устройств, известных в данной области, включая описанные в публикации патентной заявки США №. 2005/0106717 А1, описания которых включены в настоящий документ в качестве ссылки. В варианте осуществления, ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках. В варианте осуществления, ОИЛ размножают при помощи системы для размножения клеток, которая размножает ОИЛ в газопроницаемых мешках, такой как Xuri Cell Expanding System W25 (GE Healthcare). В варианте осуществления, ОИЛ размножают при помощи системы для размножения клеток, которая размножает ОИЛ в газопроницаемых мешках, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri Cell Expanding System W5 (GE Healthcare). В варианте осуществления, система для размножения клеток включает

газопроницаемый мешок для клеток с объемом, выбранным из группы, состоящей из приблизительно 100 мл, приблизительно 200 мл, приблизительно 300 мл, приблизительно 400 мл, приблизительно 500 мл, приблизительно 600 мл, приблизительно 700 мл, приблизительно 800 мл, приблизительно 900 мл, приблизительно 1 л, приблизительно 2 л, приблизительно 3 л, приблизительно 4 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л, приблизительно 10 л, приблизительно 11 л, приблизительно 12 л, приблизительно 13 л, приблизительно 14 л, приблизительно 15 л, приблизительно 16 л, приблизительно 17 л, приблизительно 18 л, приблизительно 19 л, приблизительно 20 л, приблизительно 25 л, и приблизительно 30 л. В варианте осуществления, система для размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с диапазоном объема, выбранным из группы, состоящей из диапазонов от 50 до 150 мл, от 150 до 250 мл, от 250 до 350 мл, от 350 до 450 мл, от 450 и 550 мл, от 550 до 650 мл, от 650 до 750 мл, от 750 до 850 мл, от 850 до 950 мл, до от 950 до 1050 мл. В варианте осуществления, система для размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с диапазоном объема, выбранным из группы, состоящей из диапазонов от 1 л до 2 л, от 2 л до 3 л, от 3 л до 4 л, от 4 л до 5 л, от 5 л до 6 л, от 6 л до 7 л, от 7 л до 8 л, от 8 л до 9 л, от 9 л до 10 л, от 10 л до 11 л, от 11 л до 12 л, от 12 л до 13 л, от 13 л до 14 л, от 14 л до 15 л, от 15 л до 16 л, от 16 л до 17 л, от 17 л до 18 л, от 18 л до 19 л, до от 19 л до 20 л. В варианте осуществления, система для размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток с диапазоном объема, выбранным из группы, состоящей из диапазонов от 0,5 л до 5 л, от 5 л до 10 л, от 10 л до 15 л, от 15 л до 20 л, от 20 л до 25 л, до от 25 л до 30 л. В варианте осуществления, система для размножения клеток использует время качания приблизительно 30 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часа, приблизительно 6 часа, приблизительно 7 часа, приблизительно 8 часа, приблизительно 9 часа, приблизительно 10 часа, приблизительно 11 часа, приблизительно 12 часа, приблизительно 24 часа, приблизительно 2 суток, приблизительно 3 суток, приблизительно 4 суток, приблизительно 5 суток, приблизительно 6 суток, приблизительно 7 суток, приблизительно 8 суток, приблизительно 9 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 11 суток, приблизительно 12 суток, приблизительно 13 суток, приблизительно 14 суток, приблизительно 15 суток, приблизительно 16 суток, приблизительно 17 суток, приблизительно 18 суток, приблизительно 19 суток, приблизительно 20 суток, приблизительно 21 суток, приблизительно 22 суток, приблизительно 23 суток, приблизительно 24 суток, приблизительно 25 суток, приблизительно 26 суток, приблизительно 27 суток, и приблизительно 28 суток. В варианте осуществления, система для размножения клеток использует время качания от 30 минут до 1 час, от 1 час до 12 часов, от 12 часов до 1 суток, от 1 суток до 7 суток, от 7 суток до 14 суток, от 14 суток до 21 суток, до от 21 суток до 28 суток. В варианте осуществления, система для размножения клеток использует скорость качания приблизительно 2 покачивания/минуту, приблизительно 5

покачиваний/минуту, приблизительно 10 покачиваний/минуту, приблизительно 20 покачиваний/минуту, приблизительно 30 покачиваний/минуту, и приблизительно 40 покачиваний/минуту. В варианте осуществления, система для размножения клеток использует скорость качания от 2 покачиваний/минута до 5 покачиваний/минуту, от 5 покачиваний/минуту до 10 покачиваний/минуту, от 10 покачиваний/минуту до 20 покачиваний/минуту, от 20 покачиваний/минуту до 30 покачиваний/минуту, от 30 покачиваний/минуту до 40 покачиваний/минуту. В варианте осуществления, система для размножения клеток использует угол покачивания приблизительно 2° , приблизительно 3° , приблизительно 4° , приблизительно 5° , приблизительно 6° , приблизительно 7° , приблизительно 8° , приблизительно 9° , приблизительно 10° , приблизительно 11° , и приблизительно 12° . В варианте осуществления, система для размножения клеток использует угол покачивания от 2° до 3° , от 3° до 4° , от 4° до 5° , от 5° до 6° , от 6° до 7° , от 7° до 8° , от 8° до 9° , от 9° до 10° , от 10° до 11° , и от 11° до 12° .

В варианте осуществления, способ размножения ОИЛ, полученных из опухоли жидких тканей, дополнительно содержит этап, где ОИЛ выбраны по превосходной противоопухолевой реактивности. Можно использовать любой способ селекции, известный в данной области. Например, способы, описанные в публикации патентной заявки США №. 2016/0010058 A1, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки, можно использовать для отбора ОИЛ по превосходной противоопухолевой реактивности.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу размножения популяции ОИЛ из опухоли жидких тканей, способу, включающему этапы, описанные в Jin, et al., *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283–292, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. Например, опухоль или ее часть можно помещать в ферментативную среду и механически диссоциировать в течение приблизительно 1 минуты. Затем смесь может быть инкубирована в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 , а затем снова механически разрушена примерно в течение 1 минуты. После инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 опухоль или ее часть может быть механически разрушена в третий раз примерно в течение 1 минуты. Если после третьего механического разрушения присутствуют большие куски ткани, к образцу можно применить 1 или 2 дополнительных механических диссоциации с или без 30 дополнительных минут инкубации при 37°C в 5% CO_2 . В конце последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток можно проводить разделение по градиенту плотности при помощи Фиколл. Культуры ОИЛ запускали в 24-луночных планшетах (24-луночный кластер для клеточной культуры Costar, плоскодонный; Corning Incorporated, Corning, NY), каждая лунка может быть засеяна 1×10^6 обработанными клетками опухоли или одним опухолевым фрагментом приблизительно от 1 до 8 мм^3 размером в 2 мл полной среды (CM) с IL-2 (6000 ME мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). CM содержит буфер Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 с GlutaMAX, с добавлением 10% сыворотки человека АВ, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл

гентамицина. Культуры могут быть запущены в газопроницаемых флаконах емкостью 40 мл и газопроницаемым силиконовым дном 10 см² (G-Rex 10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон), в каждый флакон может быть загружено 10–40×10⁶ жизнеспособных обработанных клеток опухоли или 5–30 опухолевых фрагментов в 10–40 мл СМ с ИЛ–2. G-Rex 10 и 24-луночные планшеты можно инкубировать во влажном инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ и через 5 суток после начала культивирования, половину среды можно удалить и заменить свежей СМ и ИЛ–2, а после суток 5, половину среды можно менять каждые 2–3 суток. Протокол второго размножения (REP) ОИЛ можно проводить при помощи флаконов Т–175 и газопроницаемых мешков или газопроницаемых флаконов G-Rex, как описано в других документах, с использованием ОИЛ, полученных из опухолей жидких тканей по настоящему изобретению. Для REP во флаконах Т–175 1×10⁶ ОИЛ можно суспендировать в 150 мл среды в каждом флаконе. ОИЛ можно культивировать в смеси 1:1 сред СМ и АИМ–V (среда 50/50) с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ–2 и 30 нг/мл антитела к CD3 (ОКТ–3). Флаконы Т–175 можно инкубировать при 37° С в 5% CO₂. Половина среды может быть заменена на сутки 5 с использованием среды 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ–2. На сутки 7 клетки из двух флаконов Т–175 можно объединить в 3 л мешок и можно добавить 300 мл АИМ–V с 5%–ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ/мл ИЛ–2 в 300 мл суспензии ОИЛ. Количество клеток в каждом мешке сумке можно считать каждые сутки или каждые два дня, и можно добавлять свежую среду для поддержания количества клеток между 0,5 и 2,0×10⁶ клеток/мл.

Для REP во флаконах емкостью 500 мл с газопроницаемыми силиконовыми днищами объемом 100 см² (например, G-Rex 100, Wilson Wolf Manufacturing, как описано в другом месте в данном документе), можно культивировать 5×10⁶ или 10×10⁶ ОИЛ в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл ИЛ–2 и 30 нг/мл антитела к CD3 (ОКТ–3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂. На сутки 5 250 мл супернатанта можно извлечь и поместить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500 об./мин. (491 g) в течение 10 минут. Полученные осадки ОИЛ могут быть ресуспендированы со 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ–2 и добавлены обратно в флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно в флаконах G-Rex 100, на сутки 7 ОИЛ в каждом G-Rex100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточная суспензия может быть разделена на три аликвоты по 100 мл, которые можно использовать для засеивания трех флаконов G-Rex100. Затем в каждый флакон можно добавить приблизительно 150 мл АИМ–V с 5%–ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ/мл ИЛ–2. Затем флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂ и через четыре дня 150 мл АИМ–V с 3000 МЕ/мл ИЛ–2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. После этого REP может быть завершен сбором клеток на сутки 14 культивирования.

В варианте осуществления, способ размножения или лечения злокачественной опухоли включает этап, где ОИЛ получают из образца опухоли пациента. Образец опухоли пациента можно получать при помощи известных в данной области способов.

Например, ОИЛ можно культивировать из ферментативно обработанной опухоли и опухолевых фрагментов от острой диссекции (приблизительно размером от 1 до приблизительно 8 мм³). Такие продукты расщепления опухоли можно получать путем инкубирования в ферментативной среде (например, буфер Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 mM глутамината, 10 мкг/мл гентамицина, 30 ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, при помощи диссоциатора для тканей). Продукты расщепления опухоли можно получать путем помещения опухоли в ферментативную среду и механической диссоциации опухоли в течение приблизительно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, с последующими повторными циклами механической диссоциации и инкубации в указанных выше условиях, до тех пор пока не останутся только маленькие кусочки ткани. В конце этого способа, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток можно проводить разделение по градиенту плотности при помощи разветвленного гидрофильного полисахарида ФИКОЛЛ. Можно использовать альтернативные известные в данной области способы, такие как способы описанные в публикации патентной заявки США №. 2012/0244133 A1, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. Любые из вышеуказанных способов можно использовать в любом из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, для способов размножения ОИЛ или способов лечения злокачественной опухоли.

В варианте осуществления, способ второго/REP размножения для ОИЛ можно проводить при помощи флаконов T-175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran, et al., J. Immunother. **2008**, 31, 742–51; Dudley, et al., J. Immunother. **2003**, 26, 332–42) или газопроницаемых изделий для культивирования (флаконы G-Rex, коммерчески доступные from Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA). Для размножения ОИЛ в флаконах T-175, в каждый флакон T-175 можно добавлять 1×10⁶ ОИЛ, суспендированных в 150 мл среды. ОИЛ можно культивировать в смеси 1:1 сред CM и AIM-V с добавлением 3000 ME (международные единицы) на мл ИЛ-2 и 30 нг на мл антитела к CD3 (например, ОКТ-3). Флаконы T-175 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂. Половина среды может быть заменена на сутки 5 с использованием среды 50/50 с 3000 ME/мл ИЛ-2. На сутки 7 клетки из двух флаконов T-175 можно объединить в 3 л мешок и можно добавить 300 мл AIM-V с 5%-ной сывороткой АВ человека и 3000 ME/мл ИЛ-2 к 300 мл суспензии ОИЛ. Количество клеток в каждом мешке считают каждые сутки или двое и добавляют свежую среду, чтобы сохранить количество клеток от 0,5 до 2,0×10⁶ клеток/мл.

В варианте осуществления, для второго/REP размножения ОИЛ в газопроницаемом флаконе емкостью 500 мл со 100 см² газопроницаемым силиконовым дном (G-Rex 100, коммерчески доступный от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, Миннесота, США), 5×10⁶ или 10×10⁶ ОИЛ можно культивировать в 400 мл 50/50 среды, дополненной 5%-ной сывороткой АВ человека, 3000 ME на мл ИЛ-2 и 30 нг на мл анти-

CD3 (ОКТ-3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂. На сутки 5 250 мл супернатанта можно удалить, поместить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500 об./мин. (оборотов в минуту; 491×g) в течение 10 минут. Осадки ОИЛ можно ресуспендировать со 150 мл свежей среды с 5%-ной сывороткой АВ человека, 3000 МЕ на мл ИЛ-2 и добавить обратно в исходные флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно в флаконах G-Rex 100, на сутки 7 ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию можно разделить на 3 аликвоты по 100 мл, которые можно использовать для посева в три флакона G-Rex 100. Затем в каждый флакон можно добавить 150 мл AIM-V с 5%-ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ на мл ИЛ-2. Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂ и через 4 суток 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл ИЛ-2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. Клетки можно собирать на сутки 14 культивирования.

В варианте осуществления, ОИЛ можно получать следующим образом. 2 мм³ фрагменты опухоли культивируют в полной среде (СМ), состоящей из среды AIM-V (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), дополненной 2 мМ глутамином (Mediatech, Inc. Manassas, VA), 100 Ед/мл пенициллина (Invitrogen Life Technologies), 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen Life Technologies), 5% инактивированной нагреванием человеческой сыворотки АВ (Valley Biomedical, Inc. Winchester, VA) и 600 МЕ/мл rhIL-2 (Chiron, Emeryville, CA). Для ферментативного расщепления опухолей жидких тканей, образцы опухоли нарезают кубиками в RPMI-1640, промывают и центрифугируют при 800 об./мин. в течение 5 минут при 15–22°C, и ресуспендируют в буфере для ферментативного расщепления (0,2 мг/мл коллагеназы и 30 ед/мл ДНКазы в RPMI-1640) с последующим вращением в течение ночи при комнатной температуре. ОИЛ, полученные из фрагментов, можно выращивать в течение 3–4 недель в СМ и размножить свежими или криоконсервировать в инактивированной нагреванием сыворотке НАВ с 10% диметилсульфоксидом (DMSO) и хранить при –180°C до момента исследования. Опухоль-ассоциированные лимфоциты (TAL), полученные из коллекций асцитной жидкости, высевали в количестве 3×10⁶ клеток/лунку в 24-луночный планшет в СМ. Рост ОИЛ проверяли приблизительно через сутки при помощи инвертированного микроскопа малой мощности.

Иллюстративный вариант осуществления способа производства ОИЛ («Способ 2А»)

Пример способа производства/размножения ОИЛ, известный как способ 2А, схематически показан на ФИГ. 22. В определенных аспектах, настоящие способы производят ОИЛ, которые способны к увеличению циклов репликации после введения индивидууму/пациенту и, таким образом, могут обеспечивать дополнительные терапевтические выгоды по сравнению с более старыми ОИЛ (т.е., ОИЛ, которые дополнительно подвергались большему числу раундов репликации до введения индивидууму/пациенту). Признаки более молодых ОИЛ описаны в литературе, например

Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157–167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122–6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258–267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1–OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415–423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125–7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123–129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53–62 (2005); и Tran, et al., *J Immunother*, 31:742–751 (2008), содержание которых включено в настоящий документ в качестве ссылки во всей полноте.

Как обсуждалось в настоящем документе, настоящее изобретение может включать в себя этап, связанный с восстановлением криоконсервированных ОИЛ для повышения их метаболической активности и, таким образом, относительного здоровья до трансплантации пациенту, и способы тестирования указанного метаболического состояния. Как в основном изложено в настоящем документе, ОИЛ, как правило, берут из образца пациента и подвергают манипуляциям для увеличения их количества до трансплантации в пациента. В некоторых вариантах осуществления с ОИЛ могут необязательно проводить генетические манипуляции, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть криоконсервированными. После оттаивания их можно также повторно стимулировать для повышения метаболизма перед вливанием пациенту.

В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая способы, обозначаемые как preREP) укорочено по сравнению с общепринятыми способами размножения до 7–14 суток, и второе размножение (включая способы, обозначаемые как REP) укорочено до 7–14 суток, как подробно обсуждается ниже, а также в примерах и на чертежах.

ФИГ. 23 иллюстрирует пример способа 2А. Как показано на ФИГ. 23 и дополнительно описано в деталях далее, в некоторых вариантах осуществления первое размножение (этап В) укорочено до 11 суток и второе размножение (этап D) укорочено до 11 суток. В некоторых вариантах осуществления комбинация первого и второго размножения (этап В и этап D) укорочена до 22 суток, как подробно описано в настоящем документе. Понятно, что способ, показанный на ФИГ. 23 и описанный далее является иллюстративным, и способы, описываемые в настоящем документе, охватывают изменения и дополнения к описанным этапам, а также любые комбинации. Иллюстративный вариант осуществления этого способа описан в заявке РСТ №. РСТ/US2018/012633, которая включена в настоящий документ в качестве ссылки в полном объеме.

А. ЭТАП А: Получение образца опухоли пациента

Как правило, ОИЛ исходно получают из образца опухоли пациента («первичный ОИЛ»), а затем размножают в более крупную популяцию для дальнейших манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют, повторно стимулируют, как описано в настоящем документе и необязательно оценивают фенотип и метаболические параметры, как показатели состояния ОИЛ.

Образец опухоли пациента можно получать при помощи известных в данной

области способов, в основном посредством хирургической резекции, игольчатой биопсии, афереза или других способов для получения образца, который содержит смесь опухолевых клеток и ОИЛ. В основном, образец опухоли может быть из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может быть опухолью жидких тканей, такой как опухоль, полученная из злокачественных опухолей системы крови. Сольдная опухоль может быть любым типом злокачественной опухоли, включая в качестве неограничивающих примеров, опухоль молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальную опухоль, опухоль легкого, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая в качестве неограничивающих примеров плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления подходящие ОИЛ получают из злокачественной меланомы, поскольку, как сообщалось, эти опухоли имеют особенно высокие уровни ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления опухоль больше, чем приблизительно 1,5 см, но меньше, чем приблизительно 4 см. В некоторых вариантах осуществления опухоль составляет менее 4 см.

После получения образец опухоли, как правило, фрагментируют при помощи острой диссекции на мелкие кусочки размером от 1 до приблизительно 8 мм³, причем размер приблизительно 2–3 мм³ является особенно подходящим. ОИЛ культивируют из этих фрагментов с использованием продуктов ферментативного расщепления опухоли. Такие продукты расщепления опухоли можно получать путем инкубации в ферментных средах (например, буфер Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, 2 мМ глутамината, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (например, при помощи тканевого диссоциатора). Продукты расщепления опухоли можно получать путем помещения опухоли в ферментативную среду и механической диссоциации опухоли в течение приблизительно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, с последующими повторными циклами механической диссоциации и инкубации в указанных выше условиях, до тех пор пока не останутся только маленькие кусочки ткани. В конце этого способа, если клеточная суспензия содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления этих клеток можно проводить разделение по градиенту плотности при помощи разветвленного гидрофильного полисахарида ФИКОЛЛ. Можно использовать альтернативные известные в данной области способы, такие как способы описанные в публикации патентной заявки США №. 2012/0244133 A1, содержание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки. Любые из вышеуказанных способов можно использовать в любом из вариантов осуществления, описываемых в настоящем документе, для способов размножения ОИЛ или способов лечения злокачественной опухоли.

Как правило, собранную клеточную суспензию называют «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

В варианте осуществления, ОИЛ можно исходно культивировать из продуктов ферментативного расщепления опухоли и фрагментов опухоли, полученных от пациентов.

В некоторых вариантах осуществления ОИЛ получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли получают путем острой диссекции. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм³ до 10 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм³ до 8 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 1 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 2 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 3 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 4 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 5 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 6 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 7 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 9 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 10 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8–27 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 10–25 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 15–25 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8–20 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 15–20 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8–15 мм³. В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно 8–10 мм³.

В некоторых вариантах осуществления число опухолевых фрагментов составляет приблизительно от 40 до приблизительно 50 фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления число опухолевых фрагментов составляет приблизительно 40 фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления число опухолевых фрагментов составляет приблизительно 50 фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 8–27 мм³, и присутствуют менее чем приблизительно 50 фрагментов опухоли.

В некоторых вариантах осуществления ОИЛ получают из продуктов расщепления опухоли. В некоторых вариантах осуществления продукты расщепления опухоли получают путем инкубации в ферментативной среде, например, но не ограничиваясь указанной, RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 Ед/мл ДНКазы, и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). После помещения опухоли в ферментативную среду, опухоль

можно механически диссоциировать в течение приблизительно 1 минуты. Раствор затем можно инкубировать в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂ и затем снова разрушать механически в течение приблизительно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C при 5% CO₂, опухоль можно разрушать механически в третий раз в течение приблизительно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления после третьего механического разрушения, если остались крупные куски проводят еще 1 или 2 дополнительных механических диссоциации образца, с или без 30 дополнительных минут инкубации при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления в конце последней инкубации, если клеточная суспензия содержит большое число эритроцитов или мертвых клеток, можно проводить разделение в градиенте плотности при помощи Фиколл для удаления этих клеток.

В. Этап В: первое размножение

После разрушения или расщепления опухолевых фрагментов на этапе А, полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, которые благоприятствуют росту ОИЛ по сравнению с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления продукты расщепления опухоли инкубируют в лунках на 2 мл wells в среде, содержащей инактивированную человеческую сыворотку АВ 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение суток, в основном, от 3 до 14 суток, что приводит к общей популяции ОИЛ, в основном, приблизительно 1×10^8 общих клеток ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода от 7 до 14 суток, что приводит к общей популяции ОИЛ, в основном, приблизительно 1×10^8 общих клеток ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода от 10 до 14 суток, что приводит к общей популяции ОИЛ, в основном, приблизительно 1×10^8 общих клеток ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода приблизительно от 11 суток, что приводит к общей популяции ОИЛ, в основном, приблизительно 1×10^8 общих клеток ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода приблизительно от 11 суток, что приводит к общей популяции ОИЛ, в основном, менее чем или равной приблизительно 200×10^6 общих клеток ОИЛ.

В предпочтительном варианте осуществления размножение ОИЛ можно проводить при помощи начального этапа размножения общих ОИЛ (Этап В, как показано на ФИГ. 23, который может включать способы, обозначаемые как pre-REP) как описано ниже и в настоящем документе, с последующим вторым размножением (Этап D, включая способы, обозначаемые как этапы протокола быстрого размножения (REP)) как описано ниже, после этапа D, и в настоящем документе, с последующей криоконсервацией по выбору, и последующим вторым этапом D (включая способы, обозначаемые как этапы повторной стимуляции REP), как описано ниже и в настоящем документе. ОИЛ, полученные этим способом можно необязательно характеризовать по фенотипическим характеристикам и

метаболическим параметрам, как описано в настоящем документе.

В вариантах осуществления, когда культуры ОИЛ запускали в 24-луночных планшетах, например, при помощи 24-луночного плоскодонного кластера для культуры клеток Costar (Corning Incorporated, Corning, NY), в каждую лунку засеивали 1×10^6 опухолевых обработанных клеток или один фрагмент опухоли в 2 мл полной среды (СМ) с ИЛ-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). В некоторых вариантах осуществления фрагмент опухоли составляет приблизительно от 1 мм^3 до 10 мм^3 .

В некоторых вариантах осуществления СМ для этапа В состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, с добавлением 10% сыворотки АВ человека, 25 мМ HEPES и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, где культуры запускали в газопроницаемых флаконах емкостью 40 мл и газопроницаемым силиконовым дном 10 см^2 (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (фиг. 1), в каждый флакон было загружено $10\text{--}40 \times 10^6$ жизнеспособных обработанных опухолевых клеток или 5–30 фрагментов опухоли в 10–40 мл СМ с ИЛ-2. И G-Rex10, и 24-луночные планшеты инкубировали во влажном инкубаторе при 37°C в 5% CO_2 и через 5 суток после начала культивирования, половину среды удаляли и заменяли свежими СМ и ИЛ-2, а после суток 5, половину СМ меняли каждые 2–3 суток.

В варианте осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит ИЛ-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл, или от 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

В некоторых вариантах осуществления способ первого размножения (включая способы, обозначаемые как pre-REP; этап В) укорочен до 3–14 суток, как обсуждается в примерах и на чертежах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение этапа В укорочено до 7–14 суток, как обсуждается в Примерах и показано на фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение этапа В укорочено до 10–14 суток, как обсуждается в Примерах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение этапа В укорочено до 11 суток, как обсуждается в Примерах.

В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15, и ИЛ-21, а также их сочетания можно вводить во время процессов этапа В, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления этап В проводят биореакторе с замкнутой

системой. В некоторых вариантах осуществления замкнутую систему используют для размножения ОИЛ, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор. В некоторых вариантах осуществления используют один биореактор, например, GREX-10 или GREX-100.

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

В некоторых вариантах осуществления общую популяцию ОИЛ с этапа В можно сразу криоконсервировать, при помощи известных в данной области и описываемых в настоящем документе способов. Альтернативно, общую популяцию ОИЛ можно подвергать второму размножению (REP), а затем криоконсервировать, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления ОИЛ с этапа В не хранят и ОИЛ с этапа В сразу переходят на этап D. В некоторых вариантах осуществления переход происходит в замкнутой системе, как далее описано в настоящем документе.

D. Этап D: Второе размножение

В некоторых вариантах осуществления клеточную популяцию ОИЛ наращивают в числе после сбора и начальной общей обработки (т.е., после Этапа А и Этапа В). Это называют в настоящем документе вторым размножением, которое может включать способы размножения, в основном, упоминаемые в данной области как способ быстрого размножения (REP). Второе размножение, в основном, осуществляется при помощи среды для культивирования, включающей ряд компонентов, в том числе, питающие клетки, источник цитокинов и антитело к CD3 в газопроницаемом контейнере. В некоторых вариантах осуществления второе размножение может включать масштабирование с целью увеличения количества ОИЛ, полученных во втором размножении.

В варианте осуществления, REP и/или второе размножение можно проводить в газопроницаемом контейнере при помощи способов по настоящему изобретению. Например, ОИЛ можно быстро размножать при помощи неспецифической стимуляции T-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). Неспецифический стимул T-клеточного рецептора может включать, например, приблизительно 30 нг/мл ОКТ3, мышинового моноклонального антитела к CD3 (коммерчески доступно у Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA). ОИЛ можно быстро размножать после стимуляции ОИЛ *in vitro* одним или несколькими антигенами злокачественной опухоли, включая их антигенные части, такие как эпитоп(-ы), которые могут быть необязательно экспрессированы из вектора, такие как связывающий пептид лейкоцитарного антигена человека A2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27L) или gp100:209-217 (210M), необязательно в присутствии T-клеточного фактора роста, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, антиген тирозиназы злокачественной опухоли, MAGE-A3, SSX-2, и VEGFR2, или их антигенные части. ОИЛ можно также быстро размножать путем повторной стимуляции тем же антигеном/антигенами злокачественной опухоли, представленном на HLA-A2-экспрессирующих антиген-презентирующих клетках. Альтернативно, ОИЛ можно

дополнительно повторно стимулировать, например, примированными облученными аутологичными лимфоцитами или облученными HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2.

В варианте осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 3000 МЕ/мл IL-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл, или приблизительно 8000 МЕ/мл IL-2. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл, или 8000 МЕ/мл IL-2.

В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ3. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит приблизительно 30 нг/мл антитела ОКТ3. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела ОКТ3. В варианте осуществления, среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ3.

В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7, IL-15, и IL-21, а также их сочетания можно вводить во время второго размножения на этапе D способов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение можно проводить в дополненной среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3, и антиген-презентирующие питающие клетки.

В некоторых вариантах осуществления антиген-презентирующие питающие клетки (APC) представляют собой РВМС. В варианте осуществления, соотношение ОИЛ к РВМС и/или антиген-презентирующим клеткам в быстром размножении и/или втором размножении составляет приблизительно от 1 до 25, приблизительно от 1 до 50,

приблизительно от 1 до 100, приблизительно от 1 до 125, приблизительно от 1 до 150, приблизительно от 1 до 175, приблизительно от 1 до 200, приблизительно от 1 до 225, приблизительно от 1 до 250, приблизительно от 1 до 275, приблизительно от 1 до 300, приблизительно от 1 до 325, приблизительно от 1 до 350, приблизительно от 1 до 375, приблизительно от 1 до 400, или приблизительно от 1 до 500. В варианте осуществления, соотношение ОИЛ к РВМС в быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 до 50 и от 1 до 300. В варианте осуществления, соотношение ОИЛ к РВМС в быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 до 100 и от 1 до 200.

В варианте осуществления, REP и/или второе размножение проводят во флаконах с общими ОИЛ, смешанными со 100– или 200–кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл антитела к CD3, ОКТ3, и 3000 МЕ/мл ИЛ–2 в 150 мл среды. Замену среды производят (в основном, замещают 2/3 среды свежей средой), до тех пор пока клетки не переносят в альтернативную камеру для роста. Альтернативные камеры для роста включают флаконы GRex и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается далее.

В некоторых вариантах осуществления второе размножение (также обозначаемое как способ REP) укорочено до 7–14 суток, как описано в примерах и на чертежах. В некоторых вариантах осуществления второе размножение укорочено до 11 суток.

В варианте осуществления, REP и/или второе размножение можно проводить при помощи флаконов T–175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran, et al., J. Immunother. **2008**, 31, 742–51; Dudley, et al., J. Immunother. **2003**, 26, 332–42) или газопроницаемых изделий для культивирования (флаконов G–Rex). Для быстрого размножения и/или второго размножения ОИЛ в флаконах T–175, в каждый флакон T–175 можно добавлять 1×10^6 ОИЛ, суспендированных в 150 мл среды. ОИЛ можно культивировать в смеси 1:1 сред CM и AIM–V с добавлением 3000 МЕ на мл ИЛ–2 и 30 нг на мл антитела к CD3. Флаконы T–175 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂. Половина среды может быть заменена на сутки 5 с использованием среды 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ–2. На сутки 7 клетки из двух флаконов T–175 можно объединить в 3 л мешок и можно добавить 300 мл AIM–V с 5%–ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ/мл ИЛ–2 к 300 мл суспензии ОИЛ. Количество клеток в каждом мешке считают каждые сутки или двое и добавляют свежую среду, чтобы сохранить количество клеток от 0,5 до $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

В варианте осуществления, REP и/или второе размножение можно проводить в газопроницаемых флаконах емкостью 500 мл со 100 см² газопроницаемыми силиконовыми днищами (G–Rex 100, коммерчески доступный от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью–Брайтон, Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 ОИЛ можно культивировать с РВМС в 400 мл 50/50 среды, дополненной 5%–ной сывороткой АВ человека, 3000 МЕ на мл ИЛ–2 и 30 нг на мл анти–CD3 (ОКТ–3). Флаконы G–Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂. На сутки 5 250 мл супернатанта можно удалить, поместить в центрифужные пробирки и центрифугировать при 1500 об./мин. (491×g) в

течение 10 минут. Осадки ОИЛ можно ресуспендировать со 150 мл свежей среды с 5%-ной сывороткой АВ человека, 3000 МЕ на мл ИЛ-2 и добавить обратно в исходные флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно в флаконах G-Rex 100, на сутки 7 ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию можно разделить на 3 аликвоты по 100 мл, которые можно использовать для посева в три флакона G-Rex 100. Затем в каждый флакон можно добавить 150 мл AIM-V с 5%-ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ на мл ИЛ-2. Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в 5% CO₂ и через 4 суток 150 мл AIM-V с 3000 МЕ на мл ИЛ-2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. Клетки можно собирать на сутки 14 культивирования.

В варианте осуществления, REP и/или второе размножение проводят в флаконах с общими ОИЛ, смешанными с 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл антитела к CD3, ОКТ3, и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в 150 мл среды. Замену среды производят (в основном, замещают 2/3 среды свежей средой), до тех пор пока клетки не переносят в альтернативную камеру для роста. Альтернативные камеры для роста включают флаконы GRex и газопроницаемые контейнеры, как более подробно обсуждается далее.

В варианте осуществления, проводят REP и/или второе размножение и дополнительно включают этап, где ОИЛ выбраны по превосходной противоопухолевой реактивности. Можно использовать любой способ селекции, известный в данной области. Например, способы, описанные в публикации патентной заявки США №. 2016/0010058 A1, описание которой включено в настоящий документ в качестве ссылки, можно использовать для отбора ОИЛ по превосходной противоопухолевой реактивности.

REP и/или второе размножение ОИЛ можно проводить при помощи флаконов T-175 и газопроницаемых мешков, как описано ранее (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) или газопроницаемых флаконов G-Rex. В некоторых вариантах осуществления REP и/или второй размножение проводят с использованием флаконов. В некоторых вариантах осуществления REP проводят при помощи газопроницаемых флаконов G-Rex. Для REP и/или второго размножения ОИЛ в флаконах T-175, приблизительно 1×10^6 ОИЛ суспендируют приблизительно в 150 мл среды и добавляют в каждый флакон T-175. ОИЛ культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными РВМС в качестве «питающих» клеток в соотношении 1:100, и клетки культивируют в 1:1 смеси сред CM и AIM-V (среда 50/50), дополненной 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Флаконы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления половину среды заменяют на сутки 5 средой 50/50 среда с 3000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления на сутки 7, клетки из двух флаконов T-175 соединяют в мешке на 3 л и добавляют 300 мл AIM-V с 5%-ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 к 300 мл суспензии ОИЛ. Количество клеток в каждом мешке считают каждые сутки или двое и добавляют свежую среду, чтобы сохранить

количество клеток от $0,5$ до $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

Для REP и/или второго размножения ОИЛ во флаконах емкостью 500 мл с газопроницаемыми силиконовыми днищами объемом 100 см^2 (G-Rex 100, Wilson Wolf), приблизительно 5×10^6 или 10×10^6 ОИЛ культивируют с облученными аллогенными РВМС в соотношении 1:100 в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Флаконы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2 . На сутки 5 250 мл супернатанта извлекают, помещают в центрифужные пробирки и центрифугируют при 1500 об./мин. (491 g) в течение 10 минут. Осадки ОИЛ затем можно ресуспендировать со 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и добавить обратно в исходные флаконы G-Rex 100. В вариантах осуществления, когда ОИЛ размножают серийно в колбах G-Rex 100, на сутки 7 ОИЛ в каждом G-Rex100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию делят на три аликвоты по 100 мл, которые применяют для засеивания трех флаконов G-Rex100. Затем в каждый флакон добавляют приблизительно 150 мл AIM-V с 5%-ной сывороткой АВ человека и 3000 МЕ/мл IL-2. Флаконы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2 и через четыре дня 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2 добавляют в каждый флакон G-Rex 100. Клетки собирают на сутки 14 культивирования.

1. Питающие клетки и антигенпрезентирующие клетки

В варианте осуществления, способы второго размножения, описываемые в настоящем документе (этап D, включая REP) требуют избытка питающих клеток во время REP-размножения ОИЛ и/или во время второго размножения ОИЛ. Во многих вариантах осуществления, питающие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), олученные из стандартных порций цельной крови от здоровых доноров крови. РВМС получают при помощи стандартных способов, таких как разделение в градиенте как Фиколл-Пак.

В основном, аллогенные РВМС инактивированы, или путем облучения или путем тепловой обработки, и применяются в способах REP, как описано в примерах, в частности, в примере 14, который предлагает иллюстративный протокол для оценки неспособности аллогенных облученных РВМС к репликации.

В некоторых вариантах осуществления РВМС считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в способах размножения ОИЛ, описываемых в настоящем документе, если общее число жизнеспособных клеток на сутки 14 меньше, чем исходное число жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на сутки 0 REP и/или сутки 0 второго размножения (т.е., начальные сутки второго размножения).

В некоторых вариантах РВМС считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в способах размножения ОИЛ, описываемых в настоящем документе, если общее число жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и IL-2 на сутки 7 и сутки 14 не увеличилось от исходного числа жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на сутки 0 REP и/или сутки 0 второго размножения (т.е., начальные сутки второго размножения). В некоторых вариантах осуществления РВМС

культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

В некоторых вариантах осуществления РВМС считаются неспособными к репликации и приемлемыми для применения в способах размножения ОИЛ, описываемых в настоящем документе, если общее число жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и ИЛ-2 на сутки 7 и сутки 14 не увеличилось от исходного числа жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на сутки 0 РЕР и/или сутки 0 второго размножения (т.е., начальные сутки второго размножения). В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 5–60 нг/мл антитела ОКТ3 и 1000–6000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 10–50 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000–5000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 20–40 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000–4000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления РВМС культивируют в присутствии 25–35 нг/мл антитела ОКТ3 и 2500–3500 МЕ/мл ИЛ-2.

В варианте осуществления, искусственные антигенпрезентирующие клетки применяют на этапе в качестве замены РВМС или в комбинации с РВМС.

2. Цитокины

В способах размножения, описываемых в настоящем документе, в основном, используют среды для культивирования с высокими дозами цитокинов, в частности ИЛ-2, известного в данной области.

Альтернативно, дополнительно возможно использование комбинаций цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения ОИЛ, с комбинациями двух или более из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, как описано в публикациях патентной заявки США №. US 2017/0107490 A1, международной публикации № WO 2015/189356, публикации патентной заявки США №. US 2017/0107490 A1, и международной публикации № WO 2015/189357, содержание которых включено посредством ссылки в полном объеме. Таким образом, возможные комбинации включают ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-2 и ИЛ-21, ИЛ-15 и ИЛ-21 и ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, с последним вариантом, находящим конкретное применение во многих вариантах осуществления. Использование комбинаций цитокинов особенно предпочтительно для получения лимфоцитов, и, в частности, Т-клеток, описанных в настоящем документе.

3. Антитела к CD3

В некоторых вариантах осуществления среды для культивирования, применяемые в способах размножения, описываемых в настоящем документе (включая РЕР), также содержат антитело к CD3. Антитело к CD3 в комбинации с ИЛ-2 индуцирует активацию Т-клеток и клеточное деление в популяции ОИЛ. Этот эффект наблюдали с полноразмерными антителами, а также Fab- и F(ab')₂-фрагментами, при этом первый вариант является более предпочтительным; см., например, Tsoukas et al., J. Immunol. **1985**1351719, включенную, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме.

Как будет понятно специалистам в данной области, существует ряд подходящих антител к человеческому CD3, которые находят применение в изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела к человеческому CD3 от различных

млекопитающих, включая в качестве неограничивающих примеров, мыши, человек, примат, крыса, и собаки антитела. В конкретных вариантах осуществления применяют антитела ОКТ3 к CD3 применяют (коммерчески доступны у Ortho–McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

Е. Этап Е: сбор ОИЛ

После этапа второго размножения, клетки можно собирать. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов второго размножения.

ОИЛ можно собирать любым подходящим стерильным способом, в том числе, например посредством центрифугирования. Способы для сбора ОИЛ хорошо известны в данной области и любой из таких известных способов можно использовать в настоящем. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают при помощи автоматизированной системы. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают при помощи полуавтоматической системы. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из второго размножения собирают при помощи полуавтоматической машины. В некоторых вариантах осуществления используют систему LOVO (коммерчески доступна у Benchmark Electronics, например). В некоторых вариантах осуществления этап сборки включает промывание ОИЛ, получение лекарственной формы с ОИЛ, и/или получение аликвот ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления клетки необязательно замораживают после сбора или в виде части сбора.

Ф. Этап F: окончательная композиция/перенос в пакет для инфузий

После завершения этапов от А до Е, клетки переносят в контейнер для применения для введения пациенту.

В варианте осуществления, ОИЛ, размноженные при помощи APC по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ОИЛ в стерильном буфере. ОИЛ, размноженные при помощи РВМС по настоящему изобретению, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде одного внутриартериального или внутривенного вливания, которое предпочтительно длится приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути введения включают интраперитонеальный, интратекальный и внутрилимфатический.

Д. Этапы дополнительного размножения

Следует иметь в виду, что любые из вышеописанных этапов от А до F можно повторять любое число раз и можно, кроме того, проводить в порядке, отличающемся от описанного.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько этапов размножения можно повторять перед окончательной композицией этапа F. Такие этапы дополнительного размножения могут включать элементы этапов первого и/или второго размножения, описанные выше (например, включать описанные компоненты в среде для

культивирования клеток). Этапы дополнительного размножения могут дополнительно включать дополнительные элементы, в том числе дополнительные компоненты в среде для культивирования клеток, которые добавляют в среду для культивирования клеток до и/или во время этапов дополнительного размножения.

В дополнительных вариантах осуществления до и после любого из этапов размножения, описанных на ФИГ. 23 и в вышеизложенных абзацах, может идти этап криоконсервации, на котором клетки, полученные на этапе размножения, консервируют при помощи известных в данной области способов для хранения до тех пор, пока они не понадобятся для оставшихся этапов способа производства/размножения.

Фармацевтические композиции, дозировки и схемы дозирования для ОИЛ, МП, и РВЛ

В варианте осуществления, ОИЛ, размноженные при помощи способов по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ОИЛ в стерильном буфере. ОИЛ, размноженные при помощи способов по настоящему изобретению, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области. Предпочтительно, ОИЛ вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно длится приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути введения включают интраперитонеальное, интратекальное и внутрелимфатическое введение.

Можно вводить любую подходящую дозу ОИЛ. Предпочтительно, вводят приблизительно от $2,3 \times 10^{10}$ до приблизительно $13,7 \times 10^{10}$ ОИЛ, в среднем приблизительно $7,8 \times 10^{10}$ ОИЛ, в частности, если злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови. В варианте осуществления, вводят приблизительно от $1,2 \times 10^{10}$ до приблизительно $4,3 \times 10^{10}$ ОИЛ.

В некоторых вариантах осуществления число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по 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 варианте осуществления, число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 , от 1×10^9 до 5×10^9 , от 5×10^9 до 1×10^{10} , от 1×10^{10} до 5×10^{10} , от 5×10^{10} до 1×10^{11} , от 5×10^{11} до 1×10^{12} , от 1×10^{12} до 5×10^{12} , и от 5×10^{12} до 1×10^{13} . В варианте осуществления изобретения, число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$. В другом варианте осуществления число ОИЛ, предлагаемых в

фармацевтических композициях по изобретению, составляет $9,5 \times 10^8$. В другом варианте осуществления число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $4,1 \times 10^8$. В другом варианте осуществления число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $2,2 \times 10^9$.

В варианте осуществления изобретения, число ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,12 \times 10^9$ до приблизительно 12×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,15 \times 10^9$ до приблизительно 11×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,2 \times 10^9$ до приблизительно 10×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,3 \times 10^9$ до приблизительно 9×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,4 \times 10^9$ до приблизительно 8×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,5 \times 10^9$ до приблизительно 7×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,6 \times 10^9$ до приблизительно 6×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,7 \times 10^9$ до приблизительно 5×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,8 \times 10^9$ до приблизительно 4×10^9 ОИЛ, приблизительно от $0,9 \times 10^9$ до приблизительно 3×10^9 ОИЛ, или приблизительно от 1×10^9 до приблизительно 2×10^9 ОИЛ.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ, предлагаемых фармацевтических композициях по 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.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет больше 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.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне 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.

В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, находится в диапазоне 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.

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

В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, больше 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 г, 3 г, 3,5 г, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г, или 10 г.

ОИЛ, предлагаемые в фармацевтических композициях по изобретению, эффективны в широком диапазоне доз. Точная доза будет зависеть от пути введения,

формы, в которой соединение вводят, пола и возраста индивидуума, которого будут лечить, массы тела индивидуума, которого будут лечить, и предпочтений и опыта лечащего врача. Также можно использовать клинически установленные дозы ОИЛ, если они подходят. Количества фармацевтических композиций, вводимых при помощи способов в настоящем документе, такие как дозы ОИЛ, будут зависеть от человека или млекопитающего, которого будут лечить, тяжести нарушения или состояния, скорости введения, распределения активных фармацевтических ингредиентов и решения лечащего врача.

В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно вводить в однократной дозе. Такое введение может быть инъекцией, например, внутривенной инъекцией. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно вводить в многократных дозах. Дозирование может быть один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, или более чем шесть раз в год. Дозирование может быть один раз в месяц, каждые две недели, раз в неделю, или раз через сутки. Введение ОИЛ может продолжаться при необходимости.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ составляет приблизительно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , и 9×10^{13} . В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ находится в диапазоне от 1×10^6 до 5×10^6 , от 5×10^6 до 1×10^7 , от 1×10^7 до 5×10^7 , от 5×10^7 до 1×10^8 , от 1×10^8 до 5×10^8 , от 5×10^8 до 1×10^9 , от 1×10^9 до 5×10^9 , от 5×10^9 до 1×10^{10} , от 1×10^{10} до 5×10^{10} , от 5×10^{10} до 1×10^{11} , от 5×10^{11} до 1×10^{12} , от 1×10^{12} до 5×10^{12} , и от 5×10^{12} до 1×10^{13} .

В варианте осуществления изобретения, клиническая доза МП, полезная для пациентов с острым миелолейкозом (ОМЛ), находится в диапазоне приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ МП. В другом варианте осуществления число МП, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $9,5 \times 10^8$ МП. В другом варианте осуществления число МП, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $4,1 \times 10^8$. В другом варианте осуществления число МП, предлагаемых в фармацевтических композициях по изобретению, составляет $2,2 \times 10^9$.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ находится в диапазоне 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 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.

В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ находится в диапазоне 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.

Эффективное количество ОИЛ можно вводить в однократной дозе или в многократных дозах или любым из приемлемых способов введения веществ, имеющих одинаковые свойства, включая интраназальный и трансдермальный пути, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, интраперитонеально, парентерально, внутримышечно, подкожно, место, путем трансплантации или прямой инъекции в опухоль, или путем ингаляции.

Способы лечения злокачественных опухолей

Вышеописанные композиции и комбинации ОИЛ, PVL и/или MPL (и их популяции) можно использовать в способе лечения гиперпролиферативных нарушений. В предпочтительном варианте осуществления они предназначены для применения в лечении злокачественных опухолей. В предпочтительном варианте осуществления изобретение

относится к способу лечения злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, такую как опухоль жидких тканей. В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, выбранную из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV).

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, которая отвечает на терапию ингибиторами PD-1 и/или PD-L1, включая пембролизумаб, ниволумаб, дурвалумаб, авелумаб или атезолизумаб.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(а) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(б) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(с) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(д) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), и где второе размножение

проводят в течение периода в 14 дней или меньше;

(е) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(f) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(а) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(b) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(с) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(d) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 дней или меньше;

(е) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(f) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, выбранную из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита

человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр (EBV).

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(a) необязательного предварительного лечения пациента по схеме лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК;

(b) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(c) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(d) проведение начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит IL-2;

(e) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(f) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(g) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы:

(a) необязательного предварительного лечения пациента по схеме лечения, включающей ингибитор киназы или ингибитор ИТК;

(b) получения опухоли от пациента путем резекции, биопсии, пункционной биопсии, или афереза, опухоли, содержащей первую популяцию ОИЛ;

(c) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(d) проведение начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция

ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит П-2;

(e) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит П-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(f) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(g) введение терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови, выбранную из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV).

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 1 для МП и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 2 для МП и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественной опухоли.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 3 для МП и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественной опухоли.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ, размноженные при помощи способа 1 для МП, способа 2 для МП или способа 3 для МП, вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения ОМЛ.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 1 для РВЛ и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественной опухоли.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 2 для PVL и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественной опухоли.

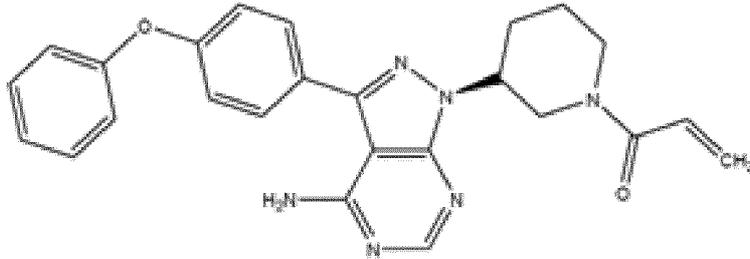
В варианте осуществления изобретения, ОИЛ размножают при помощи способа 3 для PVL и вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения злокачественной опухоли.

В варианте осуществления изобретения, ОИЛ, размноженные при помощи способа 1 для PVL, способа 2 для PVL или способа 3 для PVL, вводят пациенту в соответствии с настоящим изобретением для лечения ХЛЛ.

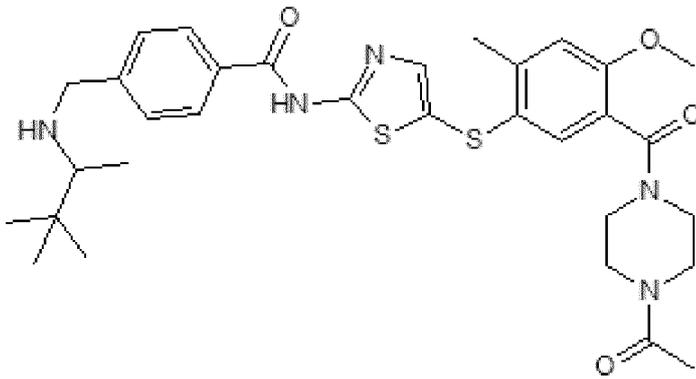
В любых из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, предлагается предварительное лечение ингибитором киназы. В варианте осуществления, ингибитор киназы выбран из группы, состоящей из иматиниба, дазатиниба, ибрутиниба, босутиниба, нилотиниба, эрлотиниба, или других киназы, ингибиторов тирозинкиназы, или ингибиторов серин/треонин киназы, известных в данной области. В варианте осуществления, схемы предварительного лечения ингибитором киназы известны в данной области и/или прописываются терапевтом.

В любых из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения, предлагается предварительное лечение ингибитором IL-2-индуцируемой T-клеточной киназы (ITK). Интерлейкин-2-индуцируемая T-клеточная киназа (ITK) представляет собой нерецепторную тирозинкиназу, которая экспрессируется в T-клетках и регулирует различные пути. В вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать любой Ингибитор ITK, известный в данной области (см., например, Lo, et al., Expert Opinion on Therapeutic Patents, 20:459-469 (2010); Vargas, et al., Scandinavian Journal of Immunology, 78(2):130-139 (2013); WO2015112847; WO2016118951; WO2007136790, US20120058984A1, и патенты США №№ 9531689 и 9695200; содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ во всей полноте). В варианте осуществления изобретения, ингибитор ITK является ковалентным ингибитором ITK, который ковалентно и необратимо связывается с ITK. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ITK является аллостерическим ингибитором ITK, который связывается с ITK. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ITK выбран из группы, состоящей из ингибиторов ITK на основе аминотиазола, ингибиторов ITK на основе 5-аминометил бензимидазолов, ингибиторов ITK на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ITK на основе (4 или 5-арил)пиразолил-индола, ингибиторов ITK на основе бензимидазола, ингибиторов ITK на основе аминобензимидазола, ингибиторов ITK на основе аминопиримидина, ингибиторов ITK на основе аминопиридина, ингибиторов ITK на основе диазолдиазина, ингибиторов ITK на основе триазола, ингибиторов ITK на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ITK на основе индолилиндазола, ингибиторов ITK на основе индола, ингибиторов ITK на основе аза-индола, ингибиторов ITK на основе пиразолил-индола, ингибиторов ITK на основе тиенопиразола, гетероциклических ингибиторов ITK, и ингибиторов ITK, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ (таких

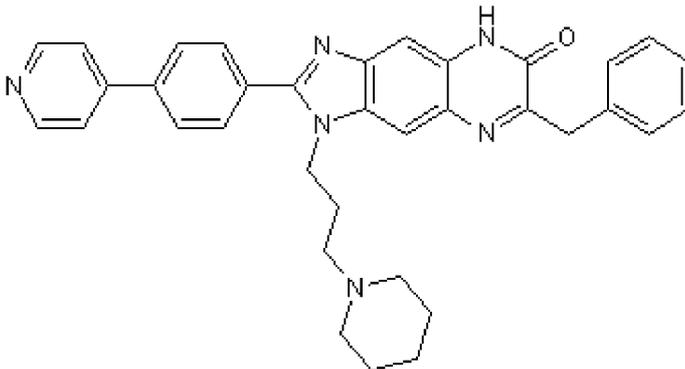
как ибрутиниб), ингибиторов ИТК на основе аза бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе бензотиазола, ингибиторов ИТК на основе индола, ингибиторов ИТК на основе пиридона, сульфохимин-замещенных пиримидиновых ингибиторов ИТК, ингибиторов ИТК на основе арилпиридинона, и любых других ингибиторов ИТК, известных в данной области. В варианте осуществления изобретения, схемы предварительного лечения ингибитором ИТК известны в данной области и/или прописываются терапевтом. В варианте осуществления изобретения, Ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из:



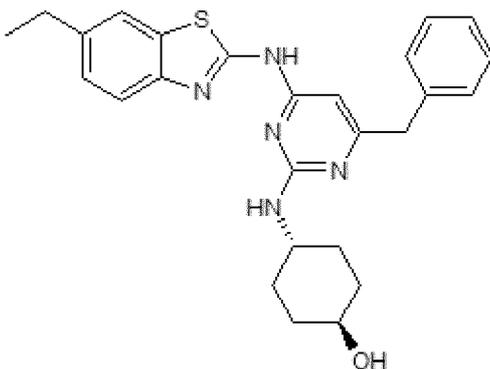
ибрутиниба,



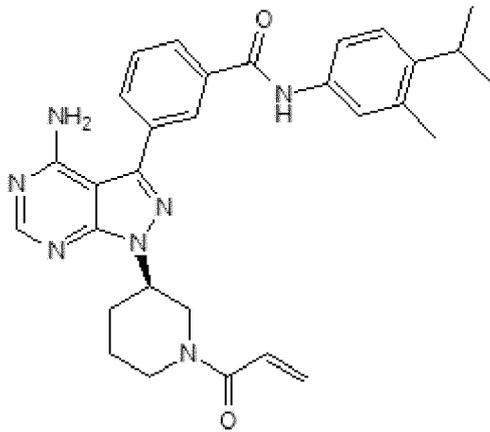
BMS509744,



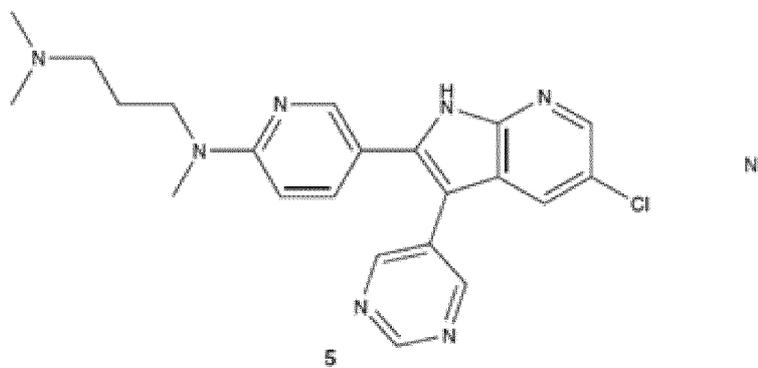
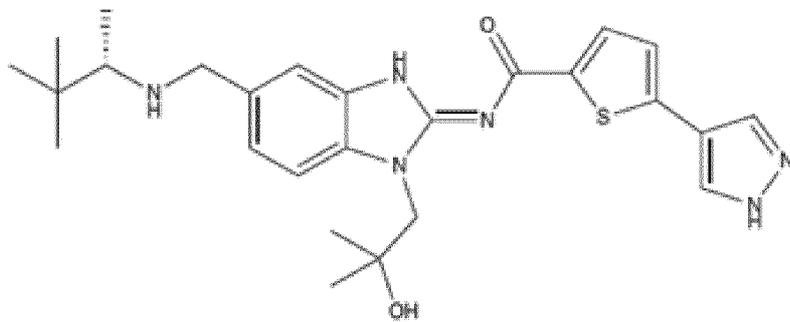
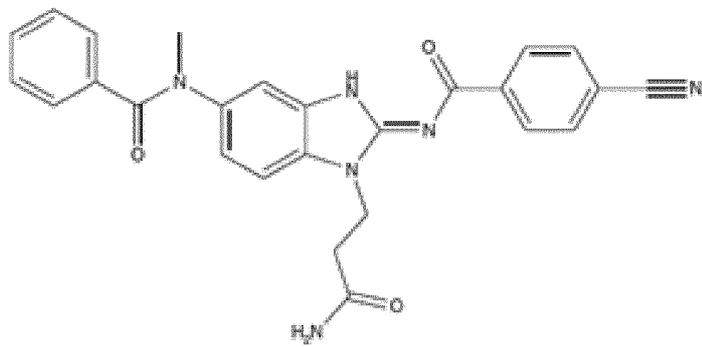
СТА056,

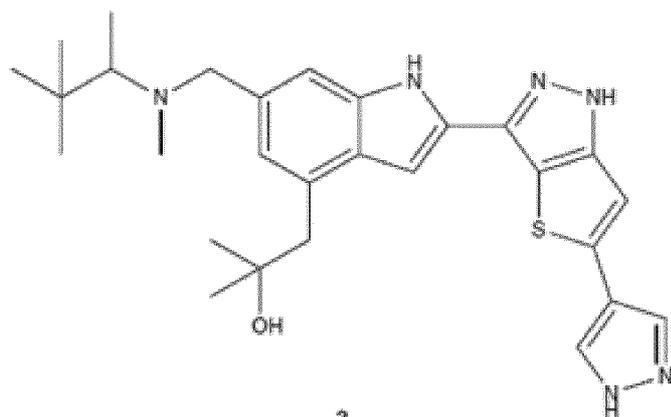
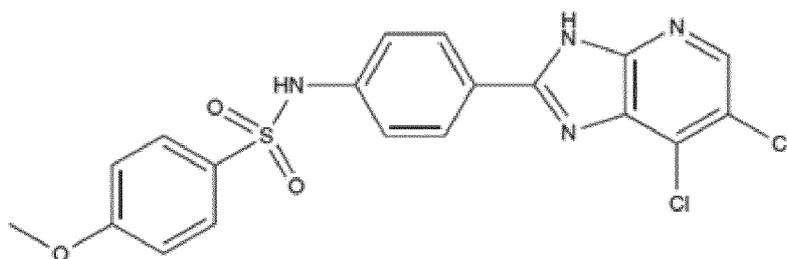
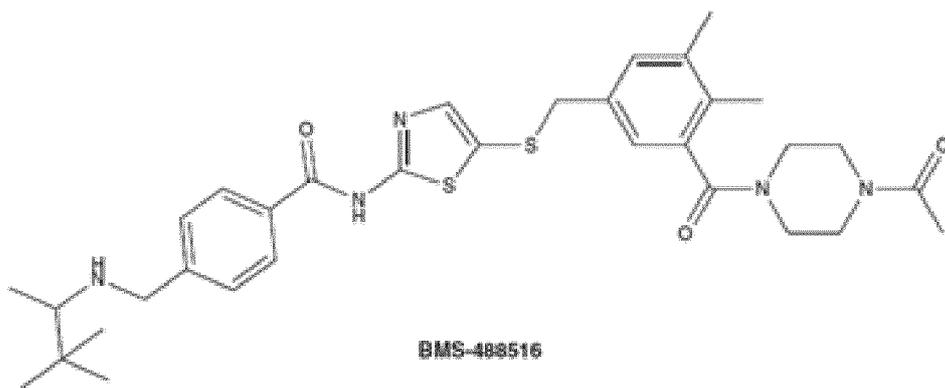
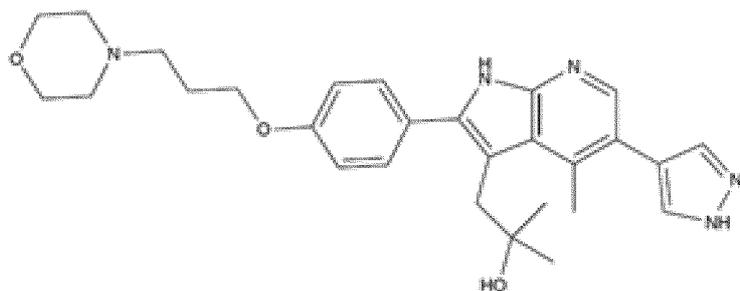


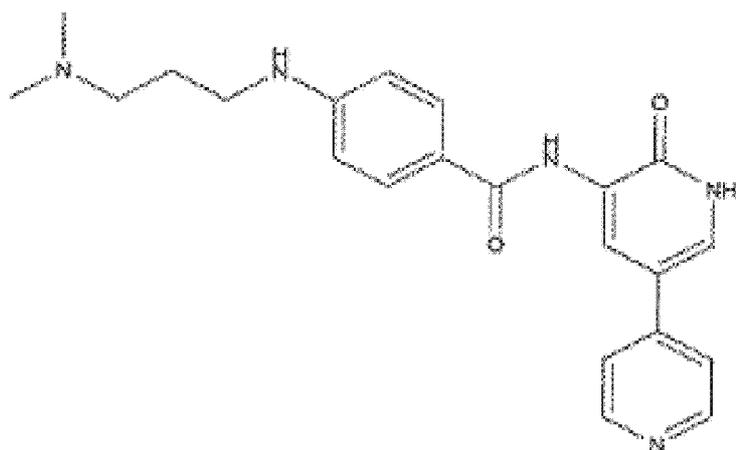
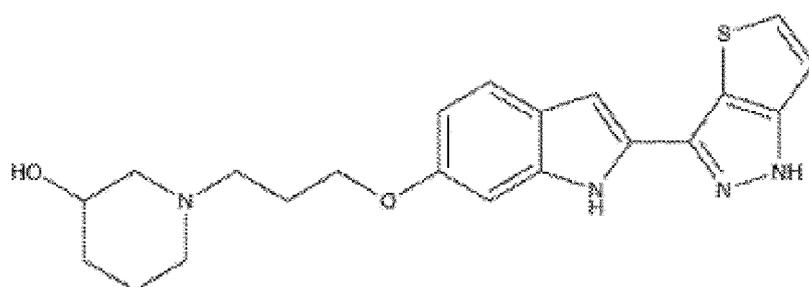
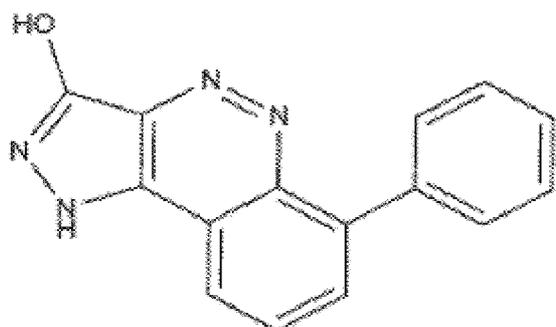
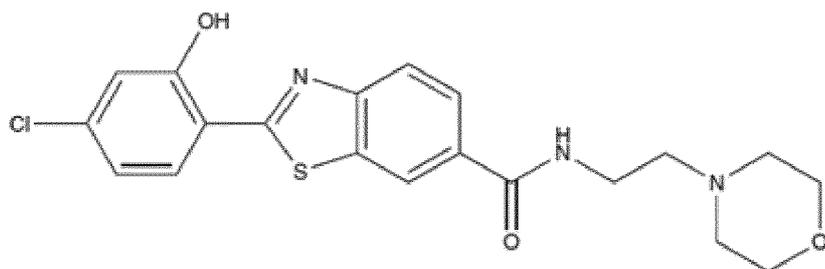
GSK2250665A,

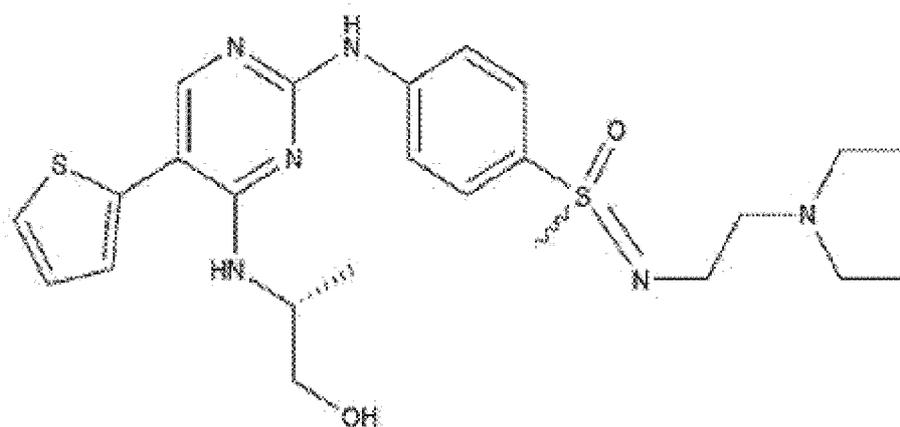
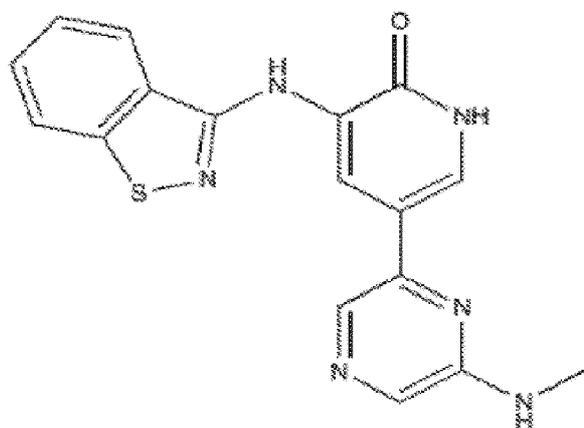
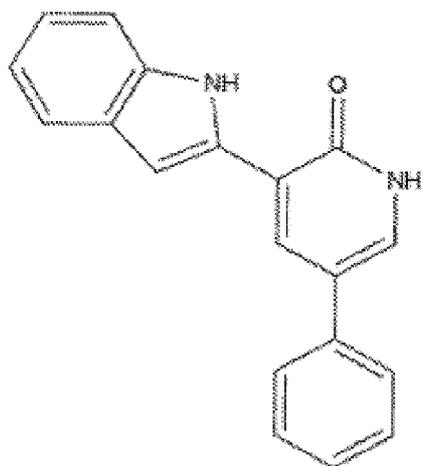


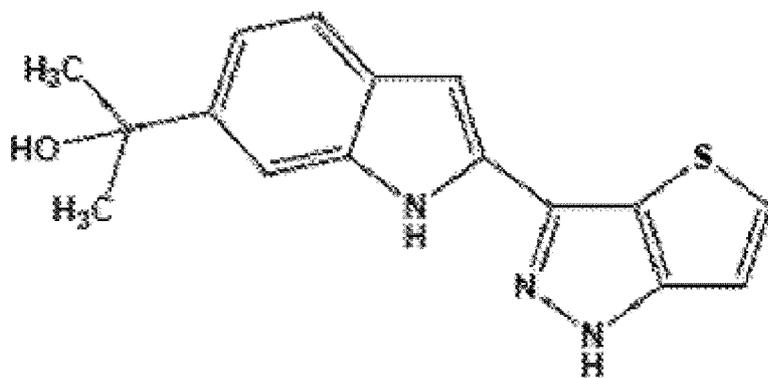
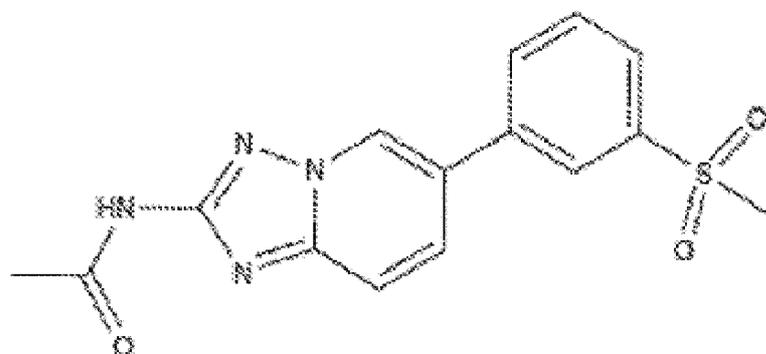
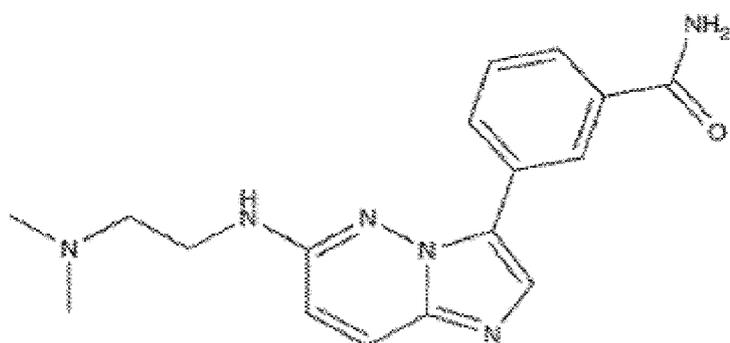
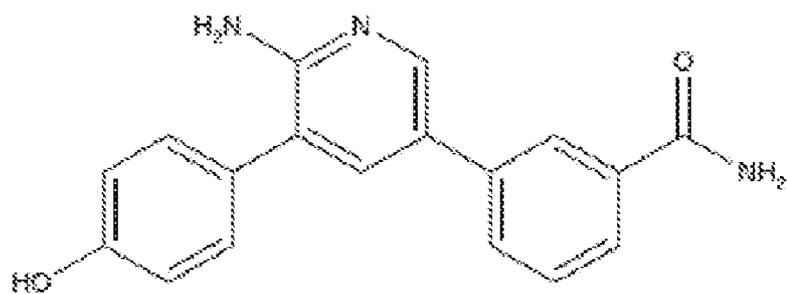
PF06465469,

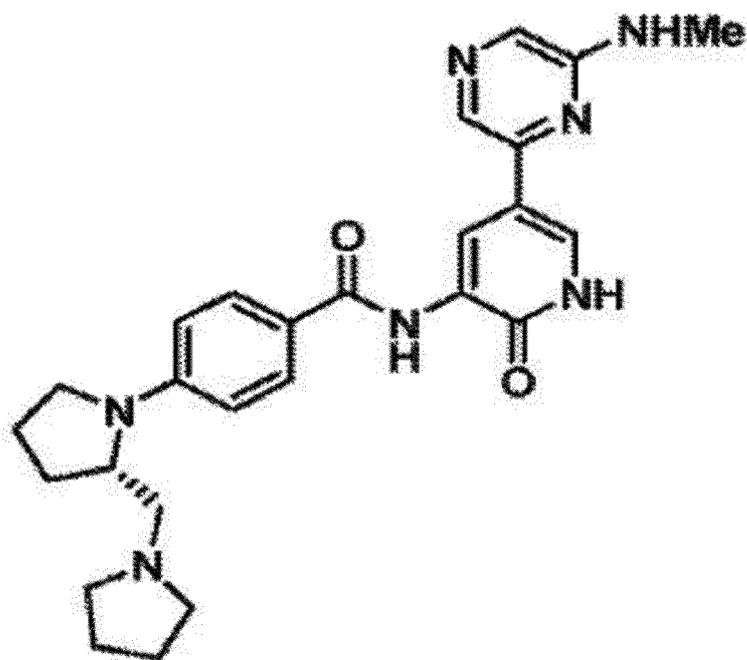
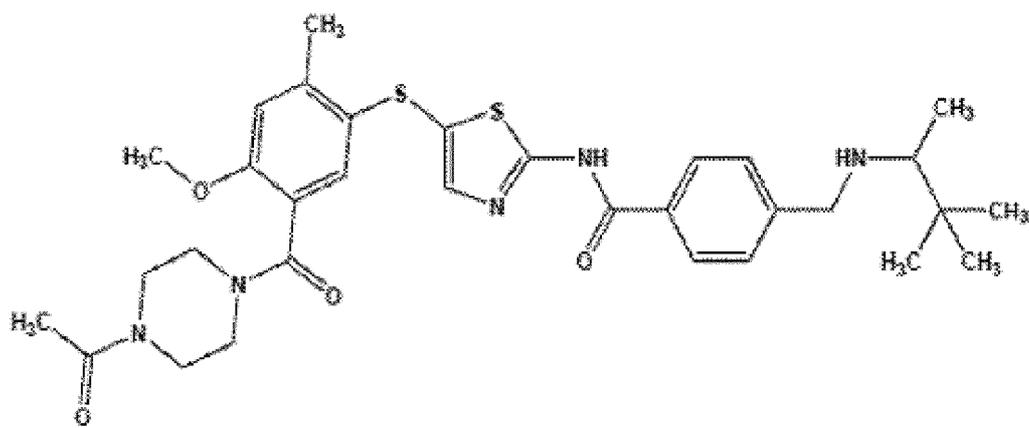
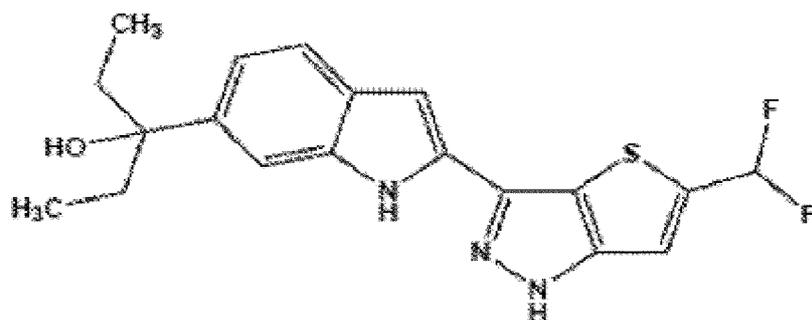


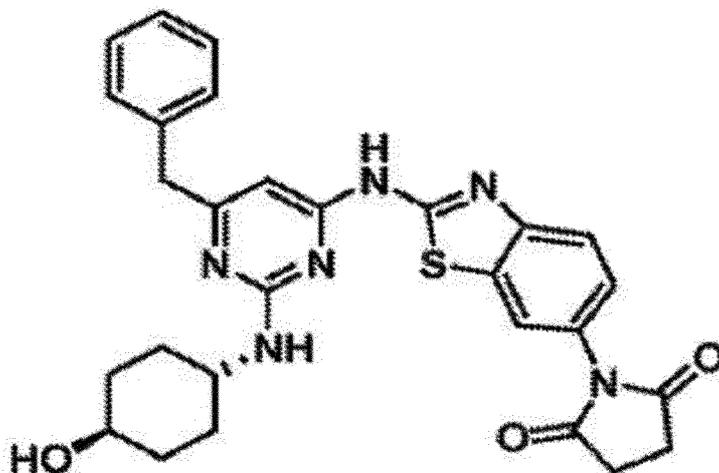
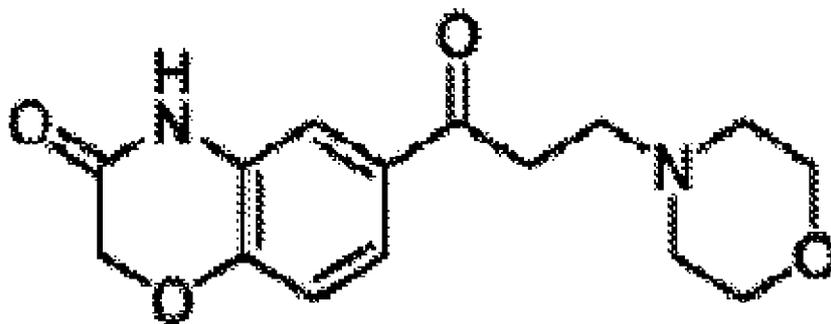












и их сочетания. В варианте осуществления изобретения, ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из иматиниба, дазатиниба (BMS-354825), Sprycel [N-(2-хлор-6-метилфенил)-2-(6-(4-(2-гидроксиэтил)-пиперазин-1-ил)-2-мет-илпиримидин-4-иламино)тиазол-5-карбоксаамид), ибрутиниба ((1-((3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]пиперидин-1-ил)проп-2-ен-1-он), босутиниба, нилотиниба, эрлотиниба, 1H-пиразоло[4,3-с]циннолин-3-ола, СТА056 (7-бензил-1-(3-(пиперидин-1-ил)пропил)-2-(4-(пиридин-4-ил)фенил)-1H-имидазо[4,5-г]квиноксалин-6(5H)-он), Соединения 10 (Boehringer Ingelheim из Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett, 18:5537-40 (2008)), Соединения 19 (Boehringer Ingelheim из Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5537-40 (2008)), Соединения 27 (Boehringer Ingelheim из Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5537-40 (2008)), Соединения 26 (Boehringer Ingelheim из Winters, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5541-4 (2008)), Соединения 37 (Boehringer Ingelheim из Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)), Соединения 41 (Boehringer Ingelheim из Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)), Соединения 48 (Boehringer Ingelheim из Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)), Соединения 51 (Boehringer Ingelheim из Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)), Соединения 10n (Boehringer Ingelheim из Riethe, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:1588-91 (2009)), Соединения 10o (Boehringer Ingelheim из Riethe, et al., Bioorg

Med Chem Lett., 19:1588–91 (2009)), Соединения 7v (Vertex из Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341–50 (2011)), Соединения 7w (Vertex из Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341–50 (2011)), Соединения 7x (Vertex из Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341–50 (2011)), Соединения 7y (Vertex из Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341–50 (2011)), Соединения 44 (Bayer Schering Pharma из vonBonin, et al., Exp Dermatol., 20:41–7 (2011)), Соединения 13 (Nycomed из Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547–59 (2010)), Соединения 24 (Nycomed из Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547–59 (2010)), Соединения 34 (Nycomed из Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547–59 (2010)), Соединения 10o (Nycomed из Herdemann, et al., Bioorg Med Chem Lett., 21:1852–6 (2011)), Соединения 3 (Sanofi US из McLean, et al., Bioorg Med Chem Lett., 22:3296–300 (2012)), Соединения 7 (Sanofi US из McLean, et al., Bioorg Med Chem Lett., 22:3296–300 (2012), и/или или других ингибиторов киназы, ингибиторов тирозин киназы, или ингибиторов серин/треонин киназы, известных в данной области, а также любых их сочетаний.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, схемы предварительного лечения, включающие ибрутиниб (коммерчески доступный в виде IMBRUVICA, и с химическим наименованием 1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]-1-пиперидинил]-2-пропен-1-он), могут включать пероральное введение одной капсулы 140 мг q.d., пероральное введение двух капсул 140 мг q.d., пероральное введение трех капсул 140 мг q.d., или пероральное введение четырех капсул 140 мг q.d., в течение приблизительно одних суток, двух суток, трех суток, четырех суток, пяти суток, шести суток, семи суток, восьми суток, девяти суток, десяти суток, одиннадцати суток, двенадцати суток, двух недель, трех недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев или шести месяцев. В вышеуказанных вариантах осуществления, схемы предварительного лечения, включающие ибрутиниб, могут также включать пероральное введение ибрутиниба в дозе, выбранной из группы, состоящей из 25 мг, 50 мг, 75 мг, 100 мг, 125 мг, 150 мг, 175 мг, 200 мг, 225 мг, 250 мг, 275 мг, 300 мг, 325 мг, 350 мг, 375 мг, 400 мг, 425 мг, 450 мг, и 500 мг, где введение происходит раз в день, два раза в день, три раза в день, или четыре раза в день, и где длительность введения выбрана из группы, состоящей из приблизительно одних суток, двух суток, трех суток, четырех суток, пяти суток, шести суток, семи суток, восьми суток, девяти суток, десяти суток, одиннадцати суток, двенадцати суток, двух недель, трех недель, одного месяца, двух месяцев, трех месяцев, четырех месяцев, пяти месяцев или шести месяцев.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления, злокачественная опухоль, подлежащая лечению, представляет собой злокачественную опухоль системы крови, выбранную из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина,

рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр (EBV). В другом варианте осуществления злокачественная опухоль системы крови представляет собой острый миелолейкоз (ОМЛ).

Эффективность способов и композиций, описываемых в настоящем документе, для лечения, профилактики и/или управления указанными заболеваниями или нарушениями можно тестировать при помощи различных моделей на животных, известных в данной области.

Не-миелоаблативное истощение лимфоцитов при помощи химиотерапии

В варианте осуществления, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли при помощи популяции ОИЛ, где пациента предварительно лечат не-миелоаблативной химиотерапией перед вливанием ОИЛ в соответствии с настоящим изобретением. В варианте осуществления, не-миелоаблативная химиотерапия представляет собой одно или несколько химиотерапевтических средств. В варианте осуществления, не-миелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид 60 мг/кг/сутки в течение 2 суток (сутки 27 и 26 перед вливанием ОИЛ) и флударабин 25 мг/м²/сутки в течение 5 суток (сутки с 27 до 23 перед вливанием ОИЛ). В варианте осуществления, после не-миелоаблативной химиотерапии и вливания ОИЛ (на сутки 0) в соответствии с настоящим изобретением, пациент получает внутривенное вливание ИЛ-2 внутривенно в количестве 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности.

Экспериментальные данные показывают, что истощение лимфоцитов перед адоптивным переносом опухолеспецифических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения путем устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («клиренс цитокинов»). Таким образом, некоторые варианты осуществления изобретения используют этап истощения лимфоцитов (иногда также обозначаемый как «иммуносупрессивное кондиционирование») у пациента до введения ОИЛ по изобретению.

Как правило, истощения лимфоцитов достигают при помощи введения флударабина или циклофосфамида (активную форму обозначают как мафосфамид) и их сочетаний. Такие способы описаны у Gassner, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, 60, 75–85, Muranski, et al., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006**, 3, 668–681, Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233–5239, и Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346–2357, содержание которых полностью включено посредством ссылки в настоящий документ.

В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 0,5 мкг/мл–10 мкг/мл флударабина. В некоторых вариантах осуществления флударабин

вводят в концентрации 1 мкг/мл флударабин. В некоторых вариантах осуществления терапию флударабином вводят в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, или 7 суток или больше. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 10 мг/кг/сутки, 15 мг/кг/сутки, 20 мг/кг/сутки, 25 мг/кг/сутки, 30 мг/кг/сутки, 35 мг/кг/сутки, 40 мг/кг/сутки, или 45 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапию флударабином вводят в течение 2–7 суток в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапию флударабином вводят в течение 4–5 суток в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапию флударабином вводят в течение 4–5 суток в дозе 25 мг/кг/сутки.

В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают при концентрации 0,5 мкг/мл – 10 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают при концентрации 1 мкг/мл путем введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления терапию циклофосфамидом вводят в течение 1 суток, 2 суток, 3 суток, 4 суток, 5 суток, 6 суток, или 7 суток или больше. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозе 100 мг/м²/сутки, 150 мг/м²/сутки, 175 мг/м²/сутки, 200 мг/м²/сутки, 225 мг/м²/сутки, 250 мг/м²/сутки, 275 мг/м²/сутки, или 300 мг/м²/сутки. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят внутривенно (т.е., в.в.) В некоторых вариантах осуществления терапию циклофосфамидом вводят в течение 2–7 суток в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления терапию циклофосфамидом вводят в течение 4–5 суток в дозе 250 мг/м²/сутки в.в. В некоторых вариантах осуществления терапию циклофосфамидом вводят в течение 4 суток at 250 мг/м²/сутки в.в.

В некоторых вариантах осуществления истощение лимфоцитов проводят путем совместного введения флударабина и циклофосфамида пациенту. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 25 мг/м²/сутки в.в. и циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м²/сутки в.в. в течение 4 суток.

В варианте осуществления, истощение лимфоцитов проводят путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сутки в течение двух суток с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сутки в течение пяти суток. Некоторые способы размножения ОИЛ, полученных из костного мозга или периферической крови, описаны в настоящем документе.

ПРИМЕРЫ

Варианты осуществления, охватываемые в данном документе, теперь описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры приведены только с целью иллюстрации, и описание, содержащееся в данном документе, никоим образом не должно рассматриваться как ограниченное этими примерами, а скорее должно толковаться как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными в результате идей изобретения, предлагаемых в настоящем документе.

Пример 1 – Размножение ОИЛ из неходжкинских лимфом

ОИЛ размножали из пяти неходжкинских лимфом (одной лимфомы мантийных клеток, трех фолликулярных лимфом, и одно диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы типа ABC) с гистологическим заключением, приведенным на ФИГ. 1, с использованием П-2 в течение периода от 11 до 14 суток на этапе pre-REP, с последующим последовательным REP в течение 14 суток с использованием П-2, митогенного антитела к CD3, и облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) в качестве питающих клеток. ОИЛ успешно получили из всех пяти лимфомных опухолей tumors с индексом максимального размножения 680 раз, значительно выше, чем ранее наблюдаемые с использованием других способов. Schwartzentruber, et al., Blood **1993**, 82, 1204–1211. Дополнительно, средняя популяция CD3⁺ Т-клеток составила 95% (по сравнению с 75% при помощи способа Schwartzentruber, et al., Blood **1993**, 82, 1204–1211).

Сортировку клеток и проточную цитометрию проводили при помощи системы FACS CANTO II Becton, Dickinson & Co. (BD). Путем анализа проточной цитометрии наблюдали заметное относительное увеличение клеток эффекторной памяти, которое было сравнимо с ОИЛ из меланомы (фиг. 2). Значимое увеличение подгрупп клеток эффекторной памяти CD45RA⁺ (TEMRA) ($p=0,0013$; CD4, CD8) и CD28+CD4⁺ ($p=0,008$) наблюдали при лимфоме, сравнимо с культурами ОИЛ меланомы (фиг. 3).

Сравнение фенотипических маркеров Т-клеточной дифференцировки в подгруппах CD4⁺ и CD8⁺ показано на ФИГ. 4 и ФИГ. 5, соответственно. Сравнение фенотипических маркеров Т-клеточного истощения в подгруппах CD4⁺ и CD8⁺ показано на ФИГ. 6 и ФИГ. 7, соответственно.

ФИГ. 8 иллюстрирует сравнение типов клеток между ОИЛ неходжкинских лимфом и ОИЛ меланомы. Показана тенденция к увеличению числа CD4⁺ Т-клеток в ОИЛ лимфом, по сравнению с ОИЛ меланом.

ФИГ. 9 иллюстрирует результаты биолюминисцентного анализа перенаправленного лизиса (BRLA). Минимальная цитолитическая активность ОИЛ, измеренная BRLA в виде LU₅₀/10⁶ на 4 час, находилась в диапазоне от <1–6 LU₅₀ и на 24 час, 1–39 LU₅₀ в ОИЛ лимфом по сравнению с ОИЛ меланом (11–75 LU₅₀, 4 часа).

ФИГ. 10 иллюстрирует результаты твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) интерферона- γ (IFN- γ) для ОИЛ лимфом по сравнению с ОИЛ меланом, показывая сопоставимые результаты. Результаты анализа ELISpot для ОИЛ лимфом показаны на ФИГ. 11 и сравниваются с результатами такого анализа для ОИЛ меланом на ФИГ. 12. В анализе ELISpot, наблюдали широкий диапазон выработки IFN- γ у ОИЛ лимфом после стимуляции форбол 12-миристан 13-ацетатом/иономицином, антителом к CD3, или гранулами с CD3/CD28/4-1BB, и IFN- γ , производимый в этих условиях некоторыми из ОИЛ лимфом был сопоставим с IFN- γ , производимым ОИЛ меланом, и в некоторых случаях, выработка IFN- γ в ОИЛ лимфом была значительно выше.

ФИГ. 13 иллюстрирует результаты анализа NANOSTRING NCOUNTER (Nanostring Technologies, Inc., Seattle, WA), показывающего, что ОИЛ лимфом экспрессируют RORC

IL17A (Th17 phenotype) и GATA3 (Th2 phenotype) по сравнению с ОИЛ меланом. Эти результаты соответствуют тому наблюдению, что лимфома-реактивные Т-клетки первично являются TH2 и TH17.

В целом, результаты свидетельствуют о том, что клеточную терапию с ОИЛ можно использовать для лечения пациентов с лимфомой.

Пример 2 – Фенотипические и функциональные характеристики лимфоцитов, инфильтрующих костный мозг (MIL), которые выращены из костного мозга пациентов с ОМЛ, и лимфоцитов периферической крови (PBL), выращенных из периферической крови пациентов с ОМЛ

Образцы костного мозга и, при доступности, образец крови получали от пациентов с острым миелолейкозом (ОМЛ), включая пациентов, которых предварительно лечили, по меньшей мере, тремя циклами схемы лечения, включающей ибрутиниб (1-[(3R)-3-[4-амино-3-(4-феноксифенил)-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-1-ил]-1-пиперидинил]-2-пропен-1-он), в сопровождении информации о возрасте пациента, поле, стадии, типе опухоли, месте злокачественной опухоли, истории лечения, отчете о выявленной патологии и любых проведенных молекулярных тестах (например, экспрессия MSI и экспрессия Raf/Ras). MIL и PBL размножали при помощи одного из Способа 1 для MIL, Способа 2 для MIL, или Способа 3 для MIL, или Способа 1 для PBL, Способа 2 для PBL, или Способа 3 для PBL, и MIL и PBL характеризовали по фенотипу и функциональности.

ФИГ. 36А и 36В иллюстрируют кратность размножения для MIL и PBL. ФИГ. 36А показывает кратность размножения для 3 пациентов (MIL1, MIL2, MIL3) и ФИГ. 36В показывает кратность размножения для дополняющих PBL для пациентов 2 и 3 (PBL2, PBL3). MIL1.1 были размножены при помощи Способа 1 для MIL, MIL1.2 были размножены при помощи Способа 2 для MIL, и MIL1.3 были размножены при помощи Способа 3 для MIL, и PBL были размножены при помощи Способа 3 для PBL. Кратность размножения для MIL1 показывает 25- (MIL1.1), 50- (MIL1.2), и 75-кратное (MIL1.3) увеличение для каждого образца в MIL1. Это предварительно демонстрирует, что Способ 3 для MIL может быть предпочтительным способом размножения. Данные кратности размножения для MIL2 и MIL3 выглядят плохо, возможно из-за малого числа начальных клеток. Для сравнения, начальное число клеток для образца MIL1 пациента 3 (MIL1.3) составило 138000 клеток, в то время как начальное число клеток MIL2 и MIL 3 составило 62000 и 28000, соответственно. Кратность размножения для PBL, показанная на ФИГ. 36В, для PBL2 и PBL3 составила приблизительно 10 раз и 40 раз, соответственно, со сходными начальными количествами клеток (338000 для PBL2 и 336000 для PBL3).

ФИГ. 37А и 37В показывают число IFN- γ -продуцирующих клеток для MIL (фиг. 37А) и парных им PBL (фиг. 37В). MIL1.3, MIL2, и MIL3 показали значительное увеличение секреции IFN- γ , указывая на то, что Способ 3 для MIL является предпочтительным способом размножения. Данные для PBL неубедительны.

ФИГ. 38А–38F показывают подгруппы TCR $\alpha\beta$ ⁺, CD4⁺, и CD8⁺ для MIL и PBL. ФИГ. 38А и 38D показывают подгруппы TCR $\alpha\beta$ ⁺ для MIL (фиг. 38А), размноженных при

помощи всех трех способов (MIL1,1, MIL1,2, MIL1,3) и для PBL (фиг. 38D), размноженных при помощи Способа 3 для PBL. Данные показывают, что подгруппы TCR $\alpha\beta$ ⁺ присутствуют почти в 100% для всех MIL и PBL, что указывает на то, что способ размножения был успешным для наращивания практически полностью T-клеток. ФИГ. 38B и 38E показывают, что подтипы CD4 снижены для MIL, размноженных Способом 3 для MIL (что коррелирует с увеличением подгрупп CD8 на ФИГ. 38C). Данные PBL data на FIGS. 38E и 38F находятся в соответствии с данными MIL1.3.

На фиг. 41A–D и 42A–D показаны данные для подгрупп CD8 в MIL (фиг. 41) и PBL (фиг. 42). На фиг. 41A и 42A показаны данные для наивных T-клеток (CCR7⁺/CD45RA⁺); На фиг. 41B и 42B показаны данные для T-клеток центральной памяти (CM) (CCR7⁺/CD45RA⁻); На фиг. 41C и 42C показаны данные для T-клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7⁻/CD45RA⁻); и фиг. 41D и 42D приведены данные для терминально дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7⁻/CD45RA⁺). Образцы, размноженные при помощи Способа 3 для MIL (MIL1.3), соответствуют подгруппам CD4 в препарате сравнения, ОИЛ меланомы. Данные для PBL2 и PBL3 применяли в качестве контроля.

На фиг.43A и 43B показаны данные для подгрупп CD4CD27 и CD8CD27 для MIL (фиг. 43A) и PBL (фиг. 43B). На фиг. 44A и 44B показаны данные для подгрупп CD4CD28 и CD8CD28 для MIL (фиг. 44A) и PBL (фиг. 44B). Данные для PBL приведены для Суток 0 и Суток 14 процесса размножения для каждого образца по сравнению с ОИЛ меланомы. Данные для MIL показаны на Сутки 0 и Сутки 14 только для MIL1.3, по сравнению с ОИЛ меланомы. Подгруппы CD28 в MIL и PBL аналогичны ОИЛ меланомы.

На фиг. 45A и 45B представлено сравнение клеток PD1⁺ в каждой из подгрупп CD4 и CD8 для MIL (фиг. 45A) и PBL (фиг. 45B). На фиг. 46A и 46B представлено сравнение клеток LAG3⁺ в каждой из подгрупп CD4 и CD8 для MIL (фиг. 46A) и PBL (фиг. 46B). Данные как для PD1⁺, так и для LAG3⁺ показывают их существенное снижение для образца MIL1.3 для измерения на Сутки 0, в то время как MIL1.1 и MIL1.2, по-видимому, имеют тенденцию к увеличению PD1 и LAG3 на Сутки 0. Данные PBL применяли в качестве контроля.

Эксперименты из этого примера демонстрируют, что MIL, размноженные Способом 3 для MIL имели более высокую кратность размножения, были высокофункциональными, имели более высокую долю подгрупп CD8 и имели меньше подгрупп T-клеток LAG3⁺ и PD1⁺. Данные также показали, что подгруппы клеток памяти были похожи на подгруппы ОИЛ меланомы. Данные также показали, что криоконсервированные образцы, по-видимому, имеют более высокое кратное размножение по сравнению со свежими образцами. Большая часть данных для образцов PBL представляется неубедительной, вероятно, из-за небольшого размера образца.

Пример 3 – Способы размножения ОИЛ и лечения злокачественных опухолей размноженными ОИЛ

Костный мозг получают при помощи аспирации иглой. Образец костного мозга

отбирают в гепаринсодержащие шприцы и хранят в течение ночи при комнатной температуре. После хранения содержимое шприцов объединяют в стерильном контейнере и проверяют на качество. Костный мозг обогащают мононуклеарными клетками (MNC) при помощи среды для разделения лимфоцитов (LSM) и центрифугирования с использованием COBE Spectra. Клетки в градиенте собирают до эритроцитов и отмывают при помощи HBSS. MNC криоконсервируют при помощи криопротектора на основе гидроксипропилкрахмала, дополненного 2% HSA и 5% DMSO, оставляя некоторые MNC для контроля качества. Флакон QC размораживают для определения содержания клеток CD3+ и CD38+/138+ в продукте MNC.

Костный мозг отбирают и фракционируют в градиенте плотности среды для разделения лимфоцитов и клетки собирают почти до уровня осадка красных клеток. Этот способ фракционирования по существу удаляет эритроциты и нейтрофилы, обеспечивая почти полный костный мозг. Полученный фракционированный материал представляет собой Т-клетки и опухолевые клетки. Костный мозг разделяют при помощи Фиколл, и ОИЛ размножают при помощи известных в данной области способов и любых способов, описанных в настоящем документе. Например, примерный способ размножения ОИЛ изображен на ФИГ. 14. Примерный способ размножения ОИЛ и лечения злокачественной опухоли пациента размноженными ОИЛ показан на ФИГ. 15.

Пример 4 – Фенотипические и функциональные характеристики опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), возвращенных из неходжкинских лимфом

Цели экспериментов, описанных в этом Примере, включают определение того, можно ли ОИЛ с терапевтическим потенциалом выделить и культивировать из опухолей НХЛ, и сравнение характеристик ОИЛ, полученных из НХЛ, с ОИЛ, полученными из меланомы.

Материалы и способы выделения и размножения ОИЛ от пациента были такими, как описано в настоящем документе. ОИЛ пациентов экстрагировали из подавляющего микроокружения опухоли путем хирургической резекции пораженного участка, в этом случае, лимфатической ткани. ОИЛ были размножены при помощи способов размножения, описываемых в настоящем документе, для получения от 10^9 до 10^{11} ОИЛ.

ОИЛ, полученные из НХЛ (1 лимфома мантийных клеток (MCL), 3 фолликулярные лимфомы (FL), 3 диффузные крупноклеточные В-клеточные лимфомы (DLBCL)) анализировали на маркеры дифференцировки по сравнению с ОИЛ, происходящими из меланомы, при помощи проточной цитометрии. ОИЛ анализировали по анти-CD56, анти-TCR α , анти-CD3, анти-CD4, анти-CD8, анти-CD27 и антителам к CD28. Эти антитела применяются как панель дифференцировки 1 (DF1). Анти-CD3, анти-CD4, анти-CD9, анти-CD38 и анти-HLA-DR, анти-CCR7 и антитела к CD45RA были использованы в качестве панели дифференцировки 2 (DF2). DF2 применяли для идентификации следующих подтипов Т-клеток: наивные (CCR7+/CD45RA+); Т-клетки центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA-); Т-клетки эффекторной памяти (EM) (CCR7-/CD45RA-); и терминально дифференцированные клетки эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7-

/CD45RA +).

На фигуре 16 представлены CD4 и CD8 Т-клетки в разных клеточных субпопуляциях при различных типах злокачественных опухолей. Тестировали типы злокачественных опухолей: меланому (черный), мантийных клеток (красный), диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому (синий) и фолликулярную лимфому (пурпурный). Фигуры 16А–16D в основном демонстрируют тенденцию к более высокой пролиферативности ОИЛ лимфом и, таким образом, имеют более высокую противоопухолевую активность по сравнению с ОИЛ меланом. Аналогично, фигура 17В показывает, что CD4/CD28–экспрессирующие Т-клетки лимфомы, обладают более высокой пролиферативной способностью, чем CD4/CD28–экспрессирующие Т-клетки меланомы.

Выработку интерферона гамма (IFN γ) у ОИЛ измеряли путем стимуляции ОИЛ с помощью Dynabeads™, покрытых МАТ (CD3, CD28 и CD137), затем при помощи ELISpot™ (Immunospot CTL) и подсчитывали при помощи входного анализатора Immunospot™ S6, а также ELISA при помощи набора DuoSet™ ELISA (R&D systems по инструкциям производителя).

Фигуры 18А и 18В демонстрируют, что выработка IFN γ у ОИЛ НХЛ и ОИЛ меланомы сходная, что указывает на сходную цитотоксичность между двумя типами ОИЛ.

Литический потенциал ОИЛ определяли при помощи биолюминисцентного анализа перенаправленного лизиса (BRLA). Клетки P815, трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим eGFP и люциферазу светлячка, применяли в качестве клеток–мишеней. ОИЛ и клетки–мишени культивируют совместно в течение 4 часов/24 часов в присутствии ОКТ3. Затем добавляют люциферин и клетки инкубируют в течение 5 минут. Биолюминисценцию измеряли при помощи люцинометра. Процент выживаемости и процент цитотоксичности рассчитывали следующим образом:

% выживаемости = (экспериментальная выживаемость – минимум)/(максимальный сигнал – минимальный сигнал) × 100

% Цитотоксичности = 100 – (% выживаемости)

Литический потенциал ОИЛ выражали в виде литической единицы, LU50, которая представляет 50–процентную цитотоксичность клеток–мишеней, индуцированную эффекторными клетками.

ОИЛ были проанализированы для определения их способности уничтожать опухоли как на аутологичных, так и на аллогенных опухолях. ОИЛ смешивали с аутологичными лимфомными клетками или аллогенными клеточными линиями (526 меланомных клеточных линий) при различных соотношениях эффекторная клетка–клетка–мишень (отношение Е:Т) – либо 10:1, 20:1, 50:1, либо 100:1. Опухолевые клетки были помечены красителем CellTrace Violet (ThermoFisher) до совместного культивирования. Через 24 часа клетки окрашивали с помощью 7–AAD для определения гибели клеток. Доля опухолевых клеток, убитых ОИЛ, была представлена как 7–AAD–

положительные опухолевые клетки, которые были отобраны по красителю CellTrace Violet по сравнению с CD19 для лимфомных клеток и CellTrace Violet по сравнению с MCSP для меланомных клеток.

На фигуре 19 показано, что ОИЛ НХЛ и ОИЛ меланомы имеют сходную цитотоксическую функциональность как против аллогенных, так и против аутологичных опухолей через 4 часа (фигура 19А) и через 24 часа (фигура 19В).

Также проводили анализ экспрессии генов на ОИЛ при помощи панели nCounter GX Human Immunology V2 (NanoString, Seattle). 100 нг тотальной РНК анализировали в соответствии с инструкциями производителя. Данные были нормализованы путем масштабирования со средним геометрическим значением встроенных контрольных генетических зондов для каждого образца. Данные картировали и сравнивали с экспрессией генов меланомы.

Фигура 21 демонстрирует результаты анализа экспрессии генов. Тепловая карта показывает кратное изменение экспрессии гена по сравнению с ОИЛ меланомы. Экспрессия IL17A и RORC из ОИЛ, полученных из лимфомы, была более высокой по сравнению с ОИЛ, полученными из меланомы.

В целом, результаты этого эксперимента продемонстрировали, что функциональные характеристики ОИЛ, полученных из лимфомы, аналогичны ОИЛ, полученным из меланомы, что указывает на то, что использование ОИЛ, полученных из лимфомы, будет успешным при лечении злокачественных лимфомных опухолей.

Пример 5 – Фенотипические и функциональные характеристики лимфоцитов периферической крови (PBL), выращенных из периферической крови пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (ХЛЛ).

Собирали РВМС от пациентов с ХЛЛ до лечения и после лечения тремя курсами ибрутиниба.

Т-клетки размножали при помощи трех разных способов, Способа 1 для РВЛ, Способа 2 для РВЛ и Способа 3 для РВЛ, как показано на фигуре 24 и в других местах в настоящем документе. Определенные образцы были получены из свежих РВМС, а некоторые образцы были получены из криоконсервированных РВМС. После того, как клетки были размножены и собраны, они были фенотипированы и функционально охарактеризованы при помощи способов, описанных в примере 4 выше и в других местах в настоящем документе. Цели этого примера состояли в том, чтобы определить оптимальный процесс размножения для РВЛ и определить, являются ли РВЛ, размноженные из образцов, после лечения ибрутинибом, более эффективными, чем РВЛ, размноженные из образцов без лечения.

Кратность размножения РВЛ показана на фигуре 26. Показаны результаты размножения РВЛ при помощи Способа 1 для РВЛ, Способа 2 для РВЛ и Способа 3 для РВЛ. РВЛ без лечения (PreRx РВЛ) показали в среднем 179-кратное размножение, а РВЛ после лечения ибрутинибом (PostRx РВЛ), показали в среднем 306-кратное размножение. РВЛ, полученные из свежих РВМС (PBL), показали только в среднем 82-кратное

размножение. Между PBL и PostRx PBL, $p=0,006$. Между PBL и PreRx PBL, $p=0,3$, и между PBL PreRx и PBL PostRx, $p=0,1$. В целом, увеличение среднего кратного размножения наблюдается для всех групп PostRx PBL по сравнению с группами как PBL, так и PreRx PBL.

Фигура 27 демонстрирует интерферон-гамма (IFN- γ) продуцирующие клетки в PBL, PreRx PBL и PostRx PBL. Для PBL среднее число клеток, продуцирующих IFN- γ , составляло приблизительно 1864. Для PBL PreRx среднее количество клеток, продуцирующих IFN- γ , составляло приблизительно 7530, а для PBL PostRx среднее количество клеток, продуцирующих IFN- γ , составляло приблизительно 11984. Между PBL и PostRx PBL, $p=0,006$. Между PBL и PreRx PBL, $p=0,006$, и между PreRx PBL и PostRx PBL, $p=0,01$. В целом, значительное увеличение среднего числа IFN- γ -продуцирующих клеток наблюдается для всех групп PostRx PBL по сравнению со всеми группами, как PBL, так и PreRx PBL.

Фенотипическую характеристику проводили для каждого из образцов. ФИГ. 28 представляет долю подгрупп CD4+и CD8+Т-клеток в PreRx PBL и PostRx PBL, и использует ОИЛ меланомы в качестве препарата сравнения. Здесь данные показывают, что подгруппы CD4 (показанные слева) были сопоставимы как для PreRx PBL, так и для PostRx PBL, независимо от того, какой способ применяли для размножения клеток. Было показано, что подгруппы CD4 в PBL PreRx и PBL PostRx больше, чем у ОИЛ меланомы ($p=0,0006$ для каждого). Подгруппы CD8 (показанные справа) были меньше, как в PreRx PBL, так и в PostRx PBL, независимо от способа, используемого для размножения клеток. Было показано, что подгруппы CD8 в PBL PreRx и PostRx PBL меньше, чем у ОИЛ меланомы ($p=0,0006$ для каждого). Предполагают, что более низкое количество подгрупп CD8 являются просто производным от типа злокачественной опухоли (т.е. в ХЛЛ подгруппы CD4, как правило, размножаются).

Фигуры 29А–29D показывают сравнение между подгруппой CD4 клеток памяти у PreRx PBL и PostRx PBL с использованием ОИЛ меланомы в качестве препарата сравнения. Фигура 29А показывает данные для наивных (CCR7+/CD45RA+); фигура 29В показывает данные для Т-клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA-); фигура 29С показывает данные для Т-клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7-/CD45RA-); и фигура 29D показывает данные для терминально дифференцированных клеток эффекторной памяти (TEMRA) (CCR7-/CD45RA +). На фигуре 29 показано, что подгруппы CD4 клеток памяти у PBL PreRx и PBL PostRx сопоставимы с теми, что наблюдаются для ОИЛ меланомы.

Фигуры 30А–30D показывают сравнение между подгруппой CD8 клеток памяти у PreRx PBL и PostRx PBL с использованием ОИЛ меланомы в качестве препарата сравнения. Фигура 30А показывает данные для наивных (CCR7+/CD45RA+); фигура 30В показывает данные для Т-клеток центральной памяти (CM) (CCR7+/CD45RA-); фигура 30С показывает данные для Т-клеток эффекторной памяти (EM) (CCR7-/CD45RA-); и фигура 30D показывает данные для терминально дифференцированных клеток

эффektorной памяти (TEMRA) (CCR7-/CD45RA +). Фигура 30 показывает, что подгруппы CD4 клеток памяти у PBL PreRx и PBL PostRx сопоставимы с теми, что наблюдаются для ОИЛ меланомы.

Фигуры 31А и 31В показывают сравнение подгрупп CD27 CD4 клеток (фиг. 31А) и CD8 клеток (фиг. 31В), с использованием ОИЛ меланомы в качестве препарата сравнения. Подгруппы CD4CD27 клеток были значительно больше у PreRx PBL ($p=0,03$) и PostRx PBL ($p=0,02$) по сравнению с ОИЛ меланомы. Подгруппы CD8CD27 клеток были значительно больше у PreRx PBL ($p=0,002$) и PostRx PBL ($p=0,001$) по сравнению с ОИЛ меланомы.

Фигуры 32А и 32В показывают сравнение подгрупп CD28 CD4 клеток клетки (фиг. 30А) и CD8 клеток (фиг. 30В), с использованием ОИЛ меланомы в качестве препарата сравнения. Было показано, что подгруппы CD4CD28 клеток и подгруппы CD8CD28 клеток сопоставимы и у PreRx PBL, и у PostRx PBL с ОИЛ меланомы.

Фигуры 33А и 33В представляют сравнение подгрупп LAG3+ в популяциях CD4+ (фиг. 33А) и CD8+ (фиг. 33В) для PreRx PBL и PostRx PBL. Данные показывают значительное среднее снижение подгрупп LAG3+ как в CD4+ ($p=0,06$), так и в CD8+ ($p=0,01$) популяциях в PostRx PBL.

Фигуры 34А и 34В представляют сравнение подгрупп PD1+ в популяциях CD4+ (фиг. 34А) и CD8+ (фиг. 34В) для PreRx PBL и PostRx PBL. Данные показывают среднее снижение подгрупп PD1+ в популяциях CD4+ и CD8+ в PostRx PBL, но это снижение не было значительным.

Фигуры 35А и 35В показывают результаты цитолитической активности PreRx PBL (фиг. 35А) и PostRx PBL (фиг. 35В), измеренные при помощи биолуминесцентного анализа перенаправленного лизиса (BRLA). Анализ проводили при помощи набора CellTrace™ Violet Cell proliferation (Invitrogen) следующим образом: эффektorные клетки, которые представляют собой PBL, были помечены сложным сукцинимидным эфиром карбоксифлуоресцеина (CFSE). Клетки-мишени (аутологичные CD19+ опухолевые клетки) инкубируют с митоцином С, а затем помечают CellTrace™ Violet (CTV) в соответствии с инструкциями к набору CellTrace™ Violet Cell proliferation. Эффектор и Клетки-мишени инкубировали в течение 24 часов при соотношениях 2:1, 5:1 и 20:1 (Е:Т-клетки). Добавляли Countbright beads, клетки окрашивали аннексином V-PI, а затем анализировали на CTV+/Annexin-V PI+ клетки (что показывает количество мертвых клеток). PostRx PBL, по-видимому, более эффективны, поскольку для уничтожения 50% целевых опухолевых клеток требуется меньше клеток (т.е. LU50 ниже для PostRx PBL, чем для PreRx PBL).

Эксперименты, проведенные в этом Примере, показали следующие результаты: PBL, размноженные из свежих PBMC из ХЛЛ, показали более низкую кратность размножения и значимо более низкую выработку IFN- γ по сравнению с PBL, размноженными из криоконсервированных PBMC (PreRx PBL и PostRx PBL); PostRx PBL показали значительно более высокую кратность размножения и значительное повышение

выработки IFN- γ по сравнению с PreRx PBL; и PreRx PBL, и PostRx PBL показали литическую активность против аутологичных (CD19+) опухолевых клеток, хотя PostRx PBL имели более низкую LU₅₀, чем PreRx PBL.

Приведенные выше примеры предназначены для того, чтобы дать специалистам в данной области полное раскрытие и описание того, как создавать и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы рассматривают как свое изобретение. Модификации описанных выше способов осуществления изобретения, очевидные для специалистов в данной области, предназначены для включения в объем последующей формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в спецификации, указывают на уровень квалификации специалистов в области, к которой относится изобретение.

Все заголовки и обозначения разделов применяются только для ясности и для справки и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области оценят полезность сочетания различных аспектов из разных заголовков и разделов при необходимости в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описываемого в настоящем документе.

Все цитируемые в настоящем документе ссылки, таким образом, полностью включены в настоящий документ в качестве ссылок и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация или патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенные в полном объеме в качестве ссылки для всех целей.

Многие модификации и варианты этой заявки могут быть сделаны без отступления от ее сущности и объема, как будет очевидно специалистам в данной области. Конкретные варианты осуществления и примеры, описываемые в настоящем документе, представлены и приведены только в качестве примера, и заявка ограничена только терминами прилагаемой формулы изобретения вместе с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется данная формула изобретения.

В варианте осуществления изобретения, МП вводят в количестве приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ МП.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Вышеуказанная сущность изобретения, а также последующее подробное описание изобретения, будут более понятны в сочетании с прилагаемыми чертежами.

ФИГ. 1 иллюстрирует информацию о гистологии лимфомных опухолей.

ФИГ. 2 иллюстрирует сравнение различных подгрупп ОИЛ лимфомы и меланомы, показывая, что подгрупп с эффекторной памятью (ЕМ) среди ОИЛ лимфомы значимо больше, чем подгрупп ЕМ среди ОИЛ меланомы.

ФИГ. 3 иллюстрирует сравнение различных подгрупп ОИЛ лимфомы и меланомы, показывая, что подгрупп $CD28^+CD4^+$ среди ОИЛ лимфомы значимо больше, чем этих же подгрупп среди ОИЛ меланомы.

ФИГ. 4 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD4^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры дифференцировки. Белые столбики на графиках показывают значения медиан. СМ относится к Т-клеткам центральной памяти, ЕМ относится к Т-клеткам эффекторной памяти, и ТЕМРА относится к $CD45RA^+$ Т-клеткам эффекторной памяти.

ФИГ. 5 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD8^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры дифференцировки. Белые столбики на графиках показывают значения медиан. СМ относится к Т-клеткам центральной памяти, ЕМ относится к Т-клеткам эффекторной памяти, и ТЕМРА относится к $CD45RA^+$ Т-клеткам эффекторной памяти.

ФИГ. 6 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD4^{++}$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры истощения. Белые столбики на графиках показывают значения медиан. LAG3 относится к лимфоцит-активирующему гену 3, PD1 относится к белку программируемой смерти 1, и TIGIT относится к Т-клеточному иммунорецептору с Ig- и ITI-доменами.

ФИГ. 7 иллюстрирует сравнение подгрупп $CD8^+$ Т-клеток из ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы, показывая маркеры истощения. Белые столбики на графиках показывают значения медиан. LAG3 относится к лимфоцит-активирующему гену 3, PD1 относится к белку программируемой смерти 1, и TIGIT относится к Т-клеточному иммунорецептору с Ig- и ITI-доменами.

ФИГ. 8 иллюстрирует сравнение типов клеток между ОИЛ неходжкинской лимфомы и ОИЛ меланомы. НК относится к клеткам-естественным киллерам, и TCRab относится к клеткам, экспрессирующим Т-клеточный рецептор с альфа- и бета-цепями.

ФИГ. 9 иллюстрирует результаты анализов билюминисцентного перенаправленного лизиса (BRLA).

ФИГ. 10 иллюстрирует результаты твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) для интерферона- γ (IFN- γ) для ОИЛ лимфомы по сравнению с ОИЛ меланомы.

ФИГ. 11 иллюстрирует результаты анализа иммуоферментных пятен (ELISpot) для ОИЛ лимфомы.

ФИГ. 12 иллюстрирует результаты анализа ELISpot для ОИЛ меланомы.

ФИГ. 13 иллюстрирует результаты анализа NANOSTRING NCOUNTER, показывая что ОИЛ лимфомы экспрессируют более высокие уровни RORC IL17A (Th17 phenotype) и GATA3 (Th2 phenotype) по сравнению ОИЛ меланомы. Соответствующие гены выделены белыми рамками на тепловой карте.

ФИГ. 14 иллюстрирует размножение ОИЛ и процесс лечения. Этап 1 относится к добавлению 4 опухолевых фрагментов во флаконы G-Rex 10. На этапе 2 получают приблизительно 40×10^6 ОИЛ или больше. На этапе 3, проводят разделение во флаконы 36G-Rex 100 для REP. ОИЛ собирают посредством центрифугирования на этапе 4. Продукт из свежих ОИЛ получают на этапе 5 после общего времени обработки приблизительно 43 суток, и в этой точке ОИЛ можно вливать пациенту.

ФИГ. 15 иллюстрирует протокол лечения для применения ОИЛ, полученных из лимфом по настоящему изобретению. Хирургическое вмешательство (и удаление опухоли) происходят в начале, и иммуноистощающая химиотерапия относится к немиелоаблативному лимфоистощению с химиотерапией, как описано повсеместно в настоящем документе.

ФИГ. 16 демонстрирует результаты анализа проточной цитометрии с использованием панели стандартных фенотипов DF2, как описано в примере 4 ниже. ОИЛ лимфомы и меланомы окрашивали с использованием панели стандартных фенотипов DF2, как описано в примере 4. Показанные данные представляют различные субпопуляции общих CD4 и CD8 T-клеток в ОИЛ. Фигура 16А демонстрирует долю CD4 и CD8 клеток для подгрупп наивных T-клеток; фигура 16В для подгрупп T-клеток центральной памяти (СМ); фигура 16С для подгрупп T-клеток эффекторной памяти (ЕМ), и фигура 16D для подгрупп терминально-дифференцированных T-клеток эффекторной памяти (TEMRA). Р-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна-Уитни (непарного). Средняя доля подгрупп клеток представлена горизонтальными столбиками.

ФИГ. 17 демонстрирует результаты анализа проточной цитометрии с использованием панели стандартных фенотипов DF1, как описано в примере 4 ниже. ОИЛ лимфомы и меланомы окрашивали с использованием панели стандартных фенотипов DF1, как описано в примере 4. Показанные данные представляют различные субпопуляции CD27+ (фиг. 17А) и CD28+ (фиг. 17В) общих CD4 и CD9 T-клеток в ОИЛ, которые указывают на более высокие доли CD4 T-клеток, экспрессирующих костимуляторную молекулу CD28, в ОИЛ лимфомы. Р-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна-Уитни (непарного).

ФИГ. 18 демонстрируют результаты теста на интерферон-гамма (IFN- γ), проведенного в соответствие с примером 4, ниже. ФИГ. 18А показывает результаты с использованием ELISpot. Данные ELISpot выражены в виде IFN- γ -продуцирующих клеток на 10^6 ОИЛ. ФИГ. 18В показывает результаты с использованием ELISA. Данные ELISA выражены в виде уровней IFN- γ в супернатантах из культур ОИЛ при 5×10^5 ОИЛ/лунку, при измерении путем ELISA (логарифмическая шкала). Р-значения рассчитывали с использованием двухстороннего критерия Манна-Уитни (непарного).

ФИГ. 19 показывает литический потенциал ОИЛ. ФИГ. 19А показывает LU₅₀ клеток–мишеней, нормализованных по 10⁶ ОИЛ за 4 часа (фиг. 19А) и 24 часа (фиг. 19В) при совместном культивировании (эффektorные клетки ОИЛ с клетками–мишенями GFP+P815).

ФИГ. 20 показывает цитолитическую активность различных ОИЛ против аллогенных и аутологических типов опухоли. ФИГ. 20А показывает цитолитическую активность ОИЛ меланомы против аллогенных клеток–мишеней 526. ФИГ. 20В показывает цитолитическую активность ОИЛ лимфомы против аутологичных опухолевых клеток, определенную путем захвата 7–AAD. Данные на Фиг. 20А и 20В показаны в виде процента мертвых клеток при совместном культивировании в соотношении эффektorная клетка:клетка–мишень (Е:Т) 50:1. ФИГ. 20С представляет процент лизиса клеток–мишеней, индуцированного ОИЛ меланомы. ФИГ. 20D представляет процент лизиса клеток–мишеней, индуцированного ОИЛ лимфомы при различных соотношений Е:Т.

ФИГ. 21 представляет собой тепловую карту, показывающую профили экспрессии генов ОИЛ лимфомы и меланомы. Профили экспрессии определяли при помощи панели 579 plex nCounter GX Human Immunology V2 CSO от NanoString. Тепловая карта показывает кратное изменение экспрессии конкретного набора генов в ОИЛ лимфомы по сравнению с ОИЛ меланомы, и подтверждает более высокую экспрессию IL–17A и RORC в ОИЛ, полученных из лимфомы. Злокачественные опухоли, показанные на этой фигуре, включают фолликулярную лимфому (ФЛ), диффузную крупноклеточную В–клеточную лимфому (ДКВЛ) и лимфому мантийных клеток (ЛМК).

ФИГ. 22 представляет собой схему, демонстрирующую способ 2А для получения ОИЛ, сбор, и расписание отправки.

ФИГ. 23 представляет собой блок–схему, демонстрирующую способ 2А для получения ОИЛ.

ФИГ. 24 представляет собой блок–схему, демонстрирующую три различных способа для размножения лимфоцитов периферической крови (PBL).

ФИГ. 25А–25С представляет три различных способа для размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг, (MPL) из костного мозга.

ФИГ. 26 представляет кратное размножение для PBL, выделенных из свежих мононуклеарных клеток периферической крови (PVMC) и из криоконсервированных PVMC. Криоконсервированные PVMC получены от пациентов с ХЛЛ, которых не лечили (PreRx PBL) или лечили (PostRx PBL) схемой лечения с ибрутинибом. Для каждой из ФИГ. 26–34, каждая точка представляет одного пациента. Заштрихованные точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 1 для PBL; белые точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 2 для PBL; черные точки представляют пациентов, чьи PBL размножали с использованием способа 3 для PBL.

/CD45RA +).

На фигуре 16 представлены CD4 и CD8 Т–клетки в разных клеточных субпопуляциях при различных типах злокачественных опухолей. Тестировали типы злокачественных опухолей: меланому, мантийных клеток, диффузную крупноклеточную В–клеточную лимфому и фолликулярную лимфому. Фигуры 16А–16D в основном демонстрируют тенденцию к более высокой пролиферативности ОИЛ лимфом и, таким образом, имеют более высокую противоопухолевую активность по сравнению с ОИЛ меланом. Аналогично, фигура 17В показывает, что CD4/CD28–экспрессирующие Т–клетки лимфомы, обладают более высокой пролиферативной способностью, чем CD4/CD28–экспрессирующие Т–клетки меланомы.

Выработку интерферона гамма (IFN γ) у ОИЛ измеряли путем стимуляции ОИЛ с помощью Dynabeads™, покрытых mAT (CD3, CD28 и CD137), затем при помощи ELISpot™ (Immunospot CTL) и подсчитывали при помощи входного анализатора Immunospot™ S6, а также ELISA при помощи набора DuoSet™ ELISA (R&D systems по инструкциям производителя).

Фигуры 18А и 18В демонстрируют, что выработка IFN γ у ОИЛ НХЛ и ОИЛ меланомы сходная, что указывает на сходную цитотоксичность между двумя типами ОИЛ.

Литический потенциал ОИЛ определяли при помощи биолюминисцентного анализа перенаправленного лизиса (BRLA). Клетки P815, трансдуцированные лентивирусным вектором, кодирующим eGFP и люциферазу светлячка, применяли в качестве клеток–мишеней. ОИЛ и клетки–мишени культивируют совместно в течение 4 часов/24 часов в присутствии ОКТ3. Затем добавляют люциферин и клетки инкубируют в течение 5 минут. Биолюминисценцию измеряли при помощи люцинометра. Процент выживаемости и процент цитотоксичности рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ выживаемости} = (\text{экспериментальная выживаемость} - \text{минимум}) / (\text{максимальный сигнал} - \text{минимальный сигнал}) \times 100$$

$$\% \text{ Цитотоксичности} = 100 - (\% \text{ выживаемости})$$

Литический потенциал ОИЛ выражали в виде литической единицы, LU50, которая представляет 50–процентную цитотоксичность клеток–мишеней, индуцированную эффекторными клетками.

ОИЛ были проанализированы для определения их способности уничтожать опухоли как на аутологичных, так и на аллогенных опухолях. ОИЛ смешивали с аутологичными лимфомными клетками или аллогенными клеточными линиями (526 меланомных клеточных линий) при различных соотношениях эффекторная клетка–клетка–мишень (отношение Е:Т) – либо 10:1, 20:1, 50:1, либо 100:1. Опухолевые клетки были помечены красителем CellTrace Violet (ThermoFisher) до совместного культивирования. Через 24 часа клетки окрашивали с помощью 7–AAD для определения гибели клеток. Доля опухолевых клеток, убитых ОИЛ, была представлена как 7–AAD–

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента при помощи популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающий этапы:

(a) необязательного предварительного лечения пациента по схеме лечения, включающей ибрутиниб;

(b) получения опухоли жидких тканей;

(c) необязательного фрагментирования или диссоциации опухоли для получения фрагментов опухоли и контактирования фрагментов опухоли с первичной средой для культивирования клеток;

(d) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, и где начальное размножение проводят в течение периода в 21 сутки или меньше;

(e) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 10 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(f) сбора третьей популяции ОИЛ; и

(g) введения терапевтически эффективной части третьей популяции ОИЛ пациенту со злокачественной опухолью;

где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий добавление ингибитора ИТК, где ингибитор ИТК необязательно представляет собой ингибитор ИТК, который ковалентно связывается с ИТК.

3. Способ по п. 2, где ингибитор ИТК добавляют к первой среде для культивирования клеток во время этапа (d), второй среде для культивирования клеток во время этапа (e), или и к первой среде для культивирования клеток во время этапа (d) и ко второй среде для культивирования клеток во время этапа (e).

4. Способ по п. 1, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ.

5. Способ по п. 4, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ибрутиниба,

дазатиниба, босутиниба, нилотиниба, эрлотиниба BMS509744, СТА056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-акрилоилпиперидин-3-ил)-4-амино-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-N-(3-метил-4-(1-метилэтил)бензамид), и их сочетаний.

6. Способ по п. 5, где ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб.

7. Способ по п. 2, где ингибитор ИТК добавляют в концентрации приблизительно от 0,1 нМ до приблизительно 5 мкМ.

8. Способ по п. 1, где начальное размножение проводят в течение периода от 3 суток до 11 суток.

9. Способ по п. 1, где второе размножение проводят в течение периода от 3 суток до 11 суток.

10. Способ по п. 1, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в первой среде для культивирования клеток.

11. Способ по п. 1, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток.

12. Способ по п. 1, где начальное размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

13. Способ по п. 1, где второе размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

14. Способ по п. 1, где первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, и их сочетаний.

15. Способ по п. 1, где вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, и их сочетаний.

16. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап лечения пациента с использованием схемы лечения с не-миелоаблативным истощением лимфоцитов перед введением третьей популяции ОИЛ пациенту.

17. Способ по п. 16, где схема лечения с не-миелоаблативным истощением лимфоцитов включает этапы введение циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сутки в течение двух суток с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сутки в течение пяти суток.

18. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап лечения пациента по схеме лечения с высокими дозами ИЛ-2 через сутки после введения третьей популяции ОИЛ пациенту.

19. Способ по п. 18, где схема лечения с высокими дозами ИЛ-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг алдеслейкина, или биоподобного препарата или его варианта, который вводят в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до переносимости.

20. Способ по п. 1, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из

острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна–Барр (EBV).

21. Способ по п. 1, где популяция пациентов представляет собой популяцию пациентов, предварительно получавшую лечение ибрутинибом.

22. Способ получения популяции опухоль–инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) из опухоли, способ, включающий этапы:

(a) фрагментирования опухоли;

(b) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, и где начальное размножение проводят в течение периода в 21 сутки или меньше;

(c) проведения второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше

(d) сбора третьей популяции ОИЛ;

где опухоль представляет собой опухоль жидких тканей, и где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль системы крови.

23. Способ по п. 22, где первую популяцию ОИЛ получают из опухоли или ее части.

24. Способ по п. 23, где опухоль или ее часть были резецированы у пациента.

25. Способ по п. 22, где начальное размножение проводят в течение периода 14 суток или меньше.

26. Способ по п. 22, где начальное размножение проводят в течение периода 11 суток или меньше.

27. Способ по п. 22, где второе размножение проводят в течение периода 11 суток

или меньше.

28. Применение опухоли жидких тканей для производства популяции ОИЛ для лечения злокачественной опухоли системы крови.

29. Способ размножения ОИЛ, полученных из костного мозга или периферической крови, способ, включающий:

(а) идентификацию первой популяции ОИЛ из образца костного мозга или периферической крови;

(б) проведение начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток для получения второй популяции ОИЛ, где вторая популяция ОИЛ, по меньшей мере, пятикратно больше по численности, чем первая популяция ОИЛ, где первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, и где начальное размножение проводят в течение периода в 21 сутки или меньше;

(с) проведение второго размножения второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток для получения третьей популяции ОИЛ, где третья популяция ОИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по численности, чем вторая популяция ОИЛ через 7 суток после начала второго размножения; где вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2, ОКТ-3 (антитело к CD3), и облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), и где второе размножение проводят в течение периода в 14 суток или меньше;

(d) сбор третьей популяции ОИЛ; и

(е) предоставление указанной третьей популяции ОИЛ указанному пациенту.

30. Способ по п. 29, где начальное размножение проводят в течение периода 11 суток или меньше.

31. Способ по п. 29, где второе размножение проводят в течение периода 11 суток или меньше.

32. Способ по п. 29, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл в первой среде для культивирования клеток.

33. Способ по п. 29, где ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток.

34. Способ по п. 29, где начальное размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

35. Способ по п. 29, где второе размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера.

36. Способ по п. 29, где первая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, и их сочетаний.

37. Способ по п. 29, где вторая среда для культивирования клеток дополнительно содержит цитокин, выбранный из группы, состоящей из ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-15, ИЛ-21, и их сочетаний.

38. Способ размножения лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови, включающий:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из периферической крови, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ B-клеток;

c. Необязательно совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ B-клетками в течение 4 суток;

d. Стимулирование указанных PBL в первой среде для культивирования клеток с использованием IL-2 и антител к CD3/CD28 в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток в газопроницаемом контейнере;

e. Культивирование PBL с этапа (d) в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток с IL-2 и антителами к CD3/CD28;

f. Выделение связанных с антителами PBL из культуры с этапа (e);

g. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (f); и

h. Сбор PBL.

39. Способ по п. 38, где первая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V.

40. Способ по п. 38, где после этапа (d) добавляют дополнительный IL-2 и первую среду для культивирования клеток меняют на вторую среду для культивирования клеток.

41. Способ по п. 38, где после этапа (e), добавляют дополнительный IL-2 и вторую среду для культивирования клеток заменяют на третью среду для культивирования клеток.

42. Способ по п. 40, где вторая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V.

43. Способ по п. 41, где третья среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V.

44. Способ по п. 40, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются различными.

45. Способ по п. 40, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются одинаковыми.

46. Способ по п. 38, где соотношение B-клеток к PBL на этапе (c) составляет приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1 (B-клетки:PBL).

47. Способ по п. 38, где соотношение B-клеток к PBL на этапе (c) выбрано из группы, состоящей из 0,1:1, 1:1, и 10:1 (B-клетки:PBL).

48. Способ по п. 38, где, по меньшей мере, приблизительно от 1×10^5 до приблизительно 10×10^5 PBL находится в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

49. Способ по п. 38, где, по меньшей мере, приблизительно от $2,5 \times 10^5$ до приблизительно 10×10^5 PBL находится в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

50. Способ по п. 38, где, по меньшей мере, 5×10^5 PBL находится в

газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

51. Способ по п. 38, где ИЛ-2 присутствует в концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл на этапах(с) и (d).

52. Способ по п. 51, где ИЛ-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл.

53. Способ по п. 38, где антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы, и соотношение PBL:гранулы составляет приблизительно 1:1 на каждом из этапов (с) и (d).

54. Способ по п. 38, дополнительно содержащий добавление ингибитора ИТК.

55. Способ по п. 54, где ингибитор ИТК добавляют, по меньшей мере, во время одного из этапов (с), (d) и (е).

56. Способ по п. 54, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных на цистеин-442 в кармане АТФ.

57. Способ по п. 56, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ибрутиниба, дазатиниба, босутиниба, нилотиниба, эрлотиниба BMS509744, СТА056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-акрилоилпиперидин-3-ил)-4-амино-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-N-(3-метил-4-(1-метилэтил)бензамид), и их сочетаний.

58. Способ по п. 57, где ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб.

59. Способ по п. 38, где способ проводят в замкнутой стерильной системе.

60. Способ размножения лимфоцитов периферической крови (PBL) из периферической крови, включающий:

а. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из периферической крови, где указанный образец необязательно является криоконсервированным, и пациента необязательно предварительно лечили ингибитором ИТК;

б. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ В-клеток и необязательно предварительная обработка указанных PBL ингибитором ИТК в концентрации от 0,1 нМ до 200 нМ;

с. Совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ В-клетками в течение периода от 2 до 5 суток;

д. Добавление приблизительно от $2,5 \times 10^5$ до приблизительно 5×10^5 клеток в газопроницаемый контейнер в первую среду для культивирования клеток и стимуляцию указанных PBL 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах и необязательно ингибитором ИТК в концентрации от 0,1 нМ до 200 нМ в течение периода от 3 до 6 суток;

е. Замену первой среды для культивирования клеток второй средой для

культивирования клеток и дополнительным ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и необязательно ингибитором ИТК в концентрации от 0,1 нМ до 200 нМ;

f. Культивирование PBL из этапа (e) в течение дополнительного периода приблизительно от 3 до 6 суток с ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах, и необязательно ингибитором ИТК в концентрации от 0,1 нМ до 200 нМ;

g. Замену второй среды для культивирования клеток на третью среду для культивирования клеток и добавление дополнительного ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и необязательно ингибитора ИТК в концентрации от 0,1 нМ до 200 нМ, и культивирование клеток в течение дополнительного периода от 2 до 5 суток;

h. Выделение связанных с антителами PBL из культуры с этапа (g);

i. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (h); и

j. Сбор PBL.

где ингибитор ИТК представляет собой ингибитор ИТК, который ковалентно связывается с ИТК.

61. Способ лечения злокачественной опухоли системы крови, способ, включающий:

a. Получение образца PBMCs из периферической крови пациента, страдающего от злокачественной опухоли системы крови;

b. Выделение PBL из указанного образца путем отбора и удаления CD19+ B-клеток;

c. Необязательно совместное культивирование указанных PBL с указанными CD19+ B-клетками;

d. Стимулирование указанных PBL в первой среде для культивирования клеток с использованием ИЛ-2 и антител к CD3/CD28 в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток в газопроницаемом контейнере;

e. Культивирование PBL с этапа (d) в течение периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток с ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28;

f. Выделение связанных с антителами PBL из культуры с этапа (e);

g. Удаление антител с PBL, выделенных на этапе (f); и

h. Сбор PBL; и

i. Введение PBL пациенту в терапевтически эффективном количестве для лечения указанной злокачественной опухоли системы крови.

62. Способ по п. 61, где пациента предварительно лечат ингибитором ИТК перед получением образца PBMC.

63. Способ по п. 62, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ингибиторов ИТК на основе аминотиазола, ингибиторов ИТК на основе бензимидазола, ингибиторов ИТК на основе аминопиримидина, ингибиторов ИТК на основе 3-аминопирид-2-онов, ингибиторов ИТК на основе индолилиндазола, ингибиторов ИТК на основе пиразолил-индола, ингибиторов тиенопиразола, и ингибиторов ИТК, нацеленных

на цистеин-442 в кармане АТФ.

64. Способ по п. 62, где ингибитор ИТК выбран из группы, состоящей из ибрутиниба, дазатиниба, босутиниба, нилотиниба, эрлотиниба BMS509744, STA056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-акрилоилпиперидин-3-ил)-4-амино-1H-пиразоло[3,4-d]пиримидин-3-ил)-N-(3-метил-4-(1-метилэтил))бензамид), и их сочетаний.

65. Способ по п. 62, где ингибитор ИТК представляет собой ибрутиниб.

66. Способ по п. 62, где пациента предварительно лечат, по меньшей мере, тремя курсами схемы лечения с ибрутинибом.

67. Способ по п. 61, где злокачественная опухоль системы крови выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV).

68. Способ по п. 61, где злокачественная опухоль системы крови представляет собой хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ).

69. Способ по п. 61, где первая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ-2, СМ-4, и АИМ-V.

70. Способ по п. 61, где после этапа (d) добавляют дополнительный П-2 и среду для культивирования клеток заменяют на вторую среду для культивирования клеток.

71. Способ по п. 70, где после этапа (e) добавляют дополнительный П-2 и вторую среду для культивирования клеток заменяют на третью среду для культивирования клеток.

72. Способ по п. 70, где вторая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ-2, СМ-4, и АИМ-V.

73. Способ по п. 71, где третья среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ-2, СМ-4, и АИМ-V.

74. Способ по п. 70, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются различными.

75. Способ по п. 70, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются одинаковыми.

76. Способ по п. 61, где соотношение В-клеток к PBL на этапе (c) составляет приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1 (В-клетки:PBL).

77. Способ по п. 61, где соотношение В-клеток к PBL на этапе (с) выбрано из группы, состоящей из 0,1:1, 1:1, и 10:1 (В-клетки:PBL).

78. Способ по п. 61, где, по меньшей мере, приблизительно от 1×10^5 до приблизительно 10×10^5 PBL находится в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

79. Способ по п. 61, где, по меньшей мере, приблизительно от $2,5 \times 10^5$ до приблизительно 10×10^5 PBL находится в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d)

80. Способ по п. 61, где, по меньшей мере, 5×10^5 PBL находится в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

81. Способ по п. 61, где IL-2 присутствует в концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл на этапах (d) и (e).

82. Способ по п. 81, где IL-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл.

83. Способ по п. 61, где антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы, и соотношение PBL:гранулы составляет приблизительно 1:1 на каждом из этапов (d) и (e).

84. Способ по п. 61, где PBL вводят в количестве приблизительно от $0,1 \times 10^9$ до приблизительно 15×10^9 PBL.

85. Способ размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг (MIL), из костного мозга, включающий:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ (фракция MIL) и клеточной фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ (ОМЛ-бластная клеточная фракция);

c. Необязательное разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции;

d. Добавление необязательно разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к клеточной фракции MIL в соотношении числа клеток приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1;

e. Культивирование одной или обеих клеточных фракций в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей IL-2;

f. Стимуляцию MIL антителами к CD3/CD28 для получения размножения MIL;

g. Повторную стимуляцию MIL IL-2 и антителами к CD3/CD28 в течение дополнительного периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток;

h. Культивирование MIL с дополнительным IL-2 в течение дополнительного периода приблизительно от 1 до приблизительно 3 суток; и

i. Сбор указанных MIL.

86. Способ по п. 85, где первая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из CM-2, CM-4, и AIM-V.

87. Способ по п. 85, где после начала этапа (e) добавляют дополнительный IL-2 и первую среду для культивирования клеток меняют на вторую среду для культивирования клеток.

88. Способ по п. 87, где вторая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ–2, СМ–4, и АИМ–V.

89. Способ по п. 87, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются различными.

90. Способ по п. 87, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются одинаковыми.

91. Способ по п. 85, где, по меньшей мере, приблизительно от 2×10^4 до приблизительно 5×10^5 МПЛ присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

92. Способ по п. 85, где, по меньшей мере, приблизительно от $2,8 \times 10^4$ до $3,4 \times 10^5$ МПЛ присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

93. Способ по п. 85, где, по меньшей мере, 5×10^5 МПЛ присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

94. Способ по п. 85, где ИЛ–2 присутствует в концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл на этапе (d).

95. Способ по п. 94, где ИЛ–2 присутствует в концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл.

96. Способ по п. 85, где присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл на этапе (f).

97. Способ по п. 85, где культивирование на этапе (d) проводят в течение периода приблизительно 3 суток.

98. Способ по п. 85, где стимуляцию на этапе (e) проводят в течение периода приблизительно 4 суток.

99. Способ по п. 85, где стимуляцию на этапе (f) проводят в течение периода приблизительно 7 суток.

100. Способ по п. 85, где дополнительный ИЛ–2 на этапе (g) присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл.

101. Способ по п. 85, где антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы, и соотношение МПЛ: гранулы составляет приблизительно 1:1 на каждом из этапов (e) и (f).

102. Способ по п. 85, где необязательно разрушаемую клеточную фракцию разрушают при помощи способа, выбранного из группы, состоящей из ультразвука, вортиксирования, вибрации и лизиса.

103. Способ по п. 85, где соотношение числа клеток ОМЛ–бластной клеточной фракции к фракции МПЛ составляет приблизительно 1:1.

104. Способ по п. 85, где способ проводят в замкнутой стерильной системе.

105. Способ размножения лимфоцитов, инфильтрирующих костный мозг (МПЛ), из костного мозга, включающий:

а. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

б. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ и клеточной

фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+;

с. Разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции и добавление разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к клеточной фракции МП в соотношении числа клеток приблизительно 1:1;

d. Культивирование ОМЛ-бластной клеточной фракции и клеточной фракции МП в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 в концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл в течение периода приблизительно от 3 суток;

e. Добавление антител к CD3/CD28, иммобилизованных на гранулах, к клеточной культуре в соотношении приблизительно 1:1 (МП:гранулы) и культивирование МП и антител в течение периода приблизительно от 1 суток;

f. Замену первой среды для культивирования клеток на вторую среду для культивирования клеток, содержащую дополнительный ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл;

g. Культивирование антител и МП в течение дополнительного периода приблизительно 3 суток

h. Повторную стимуляцию МП ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28, иммобилизованными на гранулах, в течение дополнительного периода, по меньшей мере, приблизительно 4 суток;

i. Замену второй среды для культивирования клеток на третью среду для культивирования клеток, содержащую дополнительный ИЛ-2 в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл, в течение дополнительного периода, по меньшей мере, приблизительно 3 суток; и

j. Сбор указанных МП.

106. Способ лечения злокачественной опухоли системы крови, включающий:

a. Получение образца мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) из костного мозга, где указанный образец необязательно является криоконсервированным;

b. Сортировку клеточной фракции CD3+, CD33+, CD20+ и CD14+ (фракция МП) и клеточной фракции не-CD3+, не-CD33+, не-CD20+, не-CD14+ (ОМЛ-бластная клеточная фракция);

c. Необязательное разрушение ОМЛ-бластной клеточной фракции;

d. Добавление необязательно разрушенной ОМЛ-бластной клеточной фракции к фракции МП в соотношении числа клеток приблизительно от 0,1:1 до приблизительно 10:1;

e. Культивирование одной или обеих клеточных фракций в газопроницаемом контейнере в первой среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2;

f. Стимуляцию МП антителами к CD3/CD28 для получения размножения МП;

g. Повторную стимуляцию МП ИЛ-2 и антителами к CD3/CD28 в течение дополнительного периода приблизительно от 2 до приблизительно 6 суток;

h. Культивирование МП с дополнительным ИЛ-2 в течение дополнительного

периода приблизительно от 1 до приблизительно 3 суток;

i. Сбор указанных МП; и

j. Введение указанных МП пациенту в терапевтически эффективном количестве для лечения злокачественной опухоли системы крови.

107. Способ по п. 106, где злокачественная опухоль системы крови выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (ОМЛ), лимфомы мантийных клеток (ЛМК), фолликулярной лимфомы (ФЛ), диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы (ДКВЛ), ДКВЛ с активированными В-клетками, ДКВЛ с В-клетками герминального центра, хронического лимфоцитарного лейкоза (ХЛЛ), мелкоклеточного лимфоцитарного лейкоза (МЛЛ), неходжкинской лимфомы (НХЛ), лимфомы Ходжкина, рецидивирующей и/или рефрактерной лимфомы Ходжкина, В-клеточного острого лимфобластного лейкоза (В-ОЛЛ), ОЛЛ зрелых В-клеток, лимфомы Беркитта, макроглобулинемии Вальденстрема (WM), множественной миеломы, миелодиспластических синдромов, миелофиброза, хронического миелоцитарного лейкоза, лимфомы фолликулярных центров, медленно растущей НХЛ, В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), и В-клеточной лимфомы, ассоциированной с вирусом Эпштейна-Барр (EBV).

108. Способ по п. 107, где злокачественная опухоль системы крови представляет собой острый миелолейкоз (ОМЛ).

109. Способ по п. 106, где первая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ-2, СМ-4, и АИМ-V.

110. Способ по п. 106, где после проведения этапа (e) добавляют дополнительный ИЛ-2 и первую среду для культивирования клеток меняют на вторую среду для культивирования клеток.

111. Способ по п. 110, где вторая среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из СМ-2, СМ-4, и АИМ-V.

112. Способ по п. 110, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются различными.

113. Способ по п. 110, где первая среда для культивирования клеток и вторая среда для культивирования клеток являются одинаковыми.

114. Способ по п. 106, где, по меньшей мере, приблизительно от 2×10^4 до приблизительно 5×10^5 МП присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

115. Способ по п. 106, где, по меньшей мере, приблизительно от $2,8 \times 10^4$ до $3,4 \times 10^5$ МП присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (e).

116. Способ по п. 106, где, по меньшей мере, 5×10^5 МП присутствуют в газопроницаемом контейнере в начале этапа (d).

117. Способ по п. 106, где ИЛ-2 присутствует в концентрации от 1000 МЕ/мл до 6000 МЕ/мл на этапе (d).

118. Способ по п. 117, где ИЛ-2 присутствует в концентрации приблизительно 6000

МЕ/мл.

119. Способ по п. 106, где ИЛ-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл на этапе (f).

120. Способ по п. 106, где культивирование на этапе (e) проводят в течение периода приблизительно 3 суток.

121. Способ по п. 106, где стимуляцию на этапе (f) проводят в течение периода приблизительно 4 суток.

122. Способ по п. 106, где стимуляцию на этапе (g) проводят в течение периода приблизительно 7 суток.

123. Способ по п. 106, включающий этап добавления дополнительного ИЛ-2 после этапа (f).

124. Способ по п. 123, где дополнительный ИЛ-2 присутствует в концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл.

125. Способ по п. 106, где антителами к CD3/CD28 покрывают гранулы, и соотношение гранулы:МП составляет приблизительно 1:1 на каждом из этапов (f) и (g).

126. Способ по п. 106, где МП вводят в количестве приблизительно от 4×10^8 до приблизительно $2,5 \times 10^9$ МП.

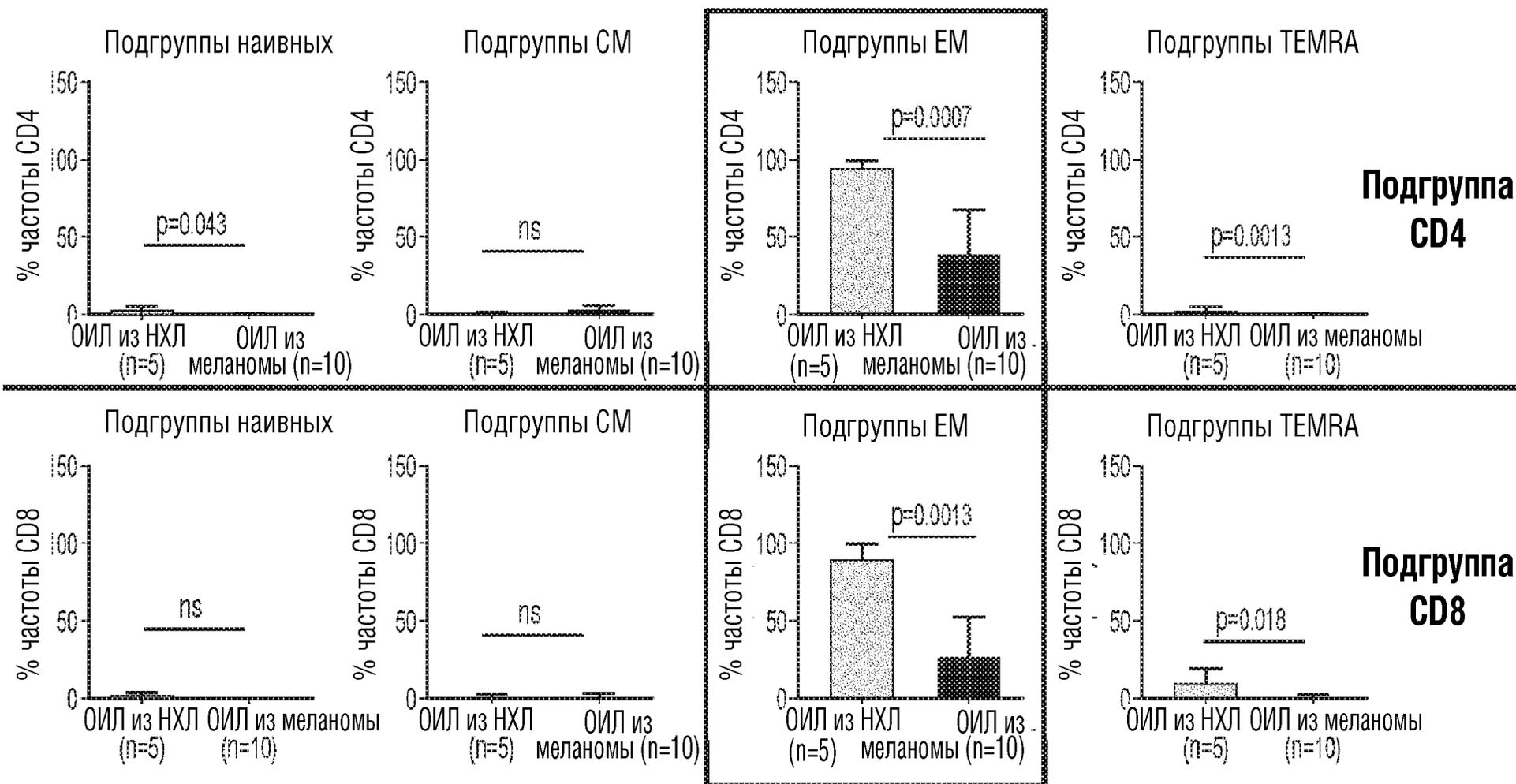
ФИГ.1

NHL	Название поставщика	Пол	Возраст	Гистологический подтип	Степень	Положительные маркеры	Место
NHL17001	530-A992	М	75	Лимфома мантийных клеток (ЛМК)	обычная, не агрессивная	CD19, CD20, CD5, CYCLIN-D+	Левый паховый
NHL17001	530-A993	Ж	55	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	1	CD20, CD10, BCL2	Левый, уровень III
NHL17001	850-B104	М	63	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	1–2 из 3	BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD3, CD5, CD10, CD20, CD43, PAX5	Правая рука (опухоль мягких тканей)
NHL17001	310-E799	М	62	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	не описана	CD3, CD5, CD10, CD15, CD20, CD30, CD45, Pax-5, Ki-67	Правая опухоль, уровень II, правая задняя опухоль (резекция)
NHL17001	850-B327	Ж	33	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВКЛ)	Крупноклеточная В-клеточная лимфома высокой степени	BCL1, BCL2, BCL6, CD3, CD20, C-MYC, CD30, MUM-1	Опухоль средостения

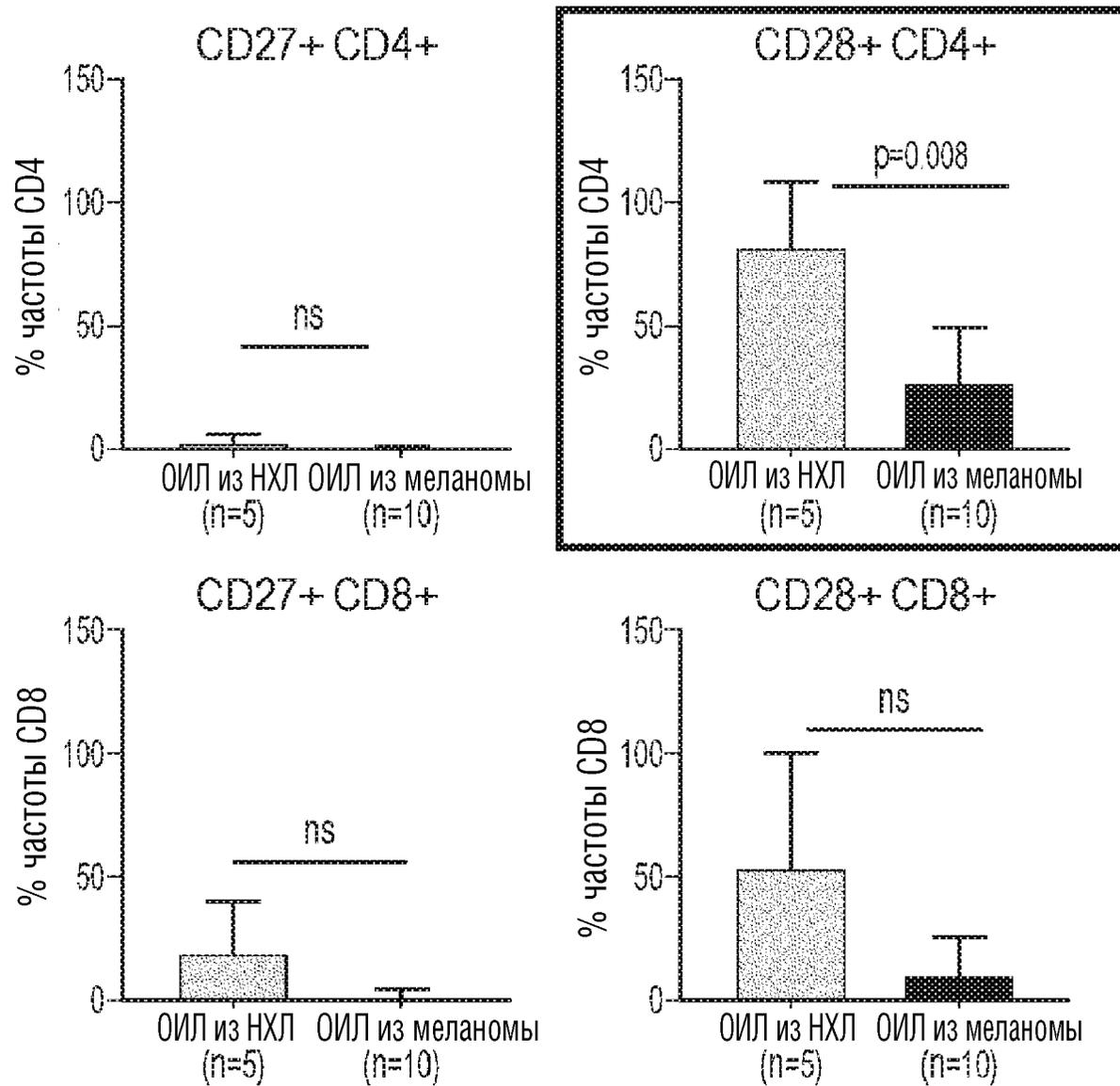
1/49

559734

ФИГ.2



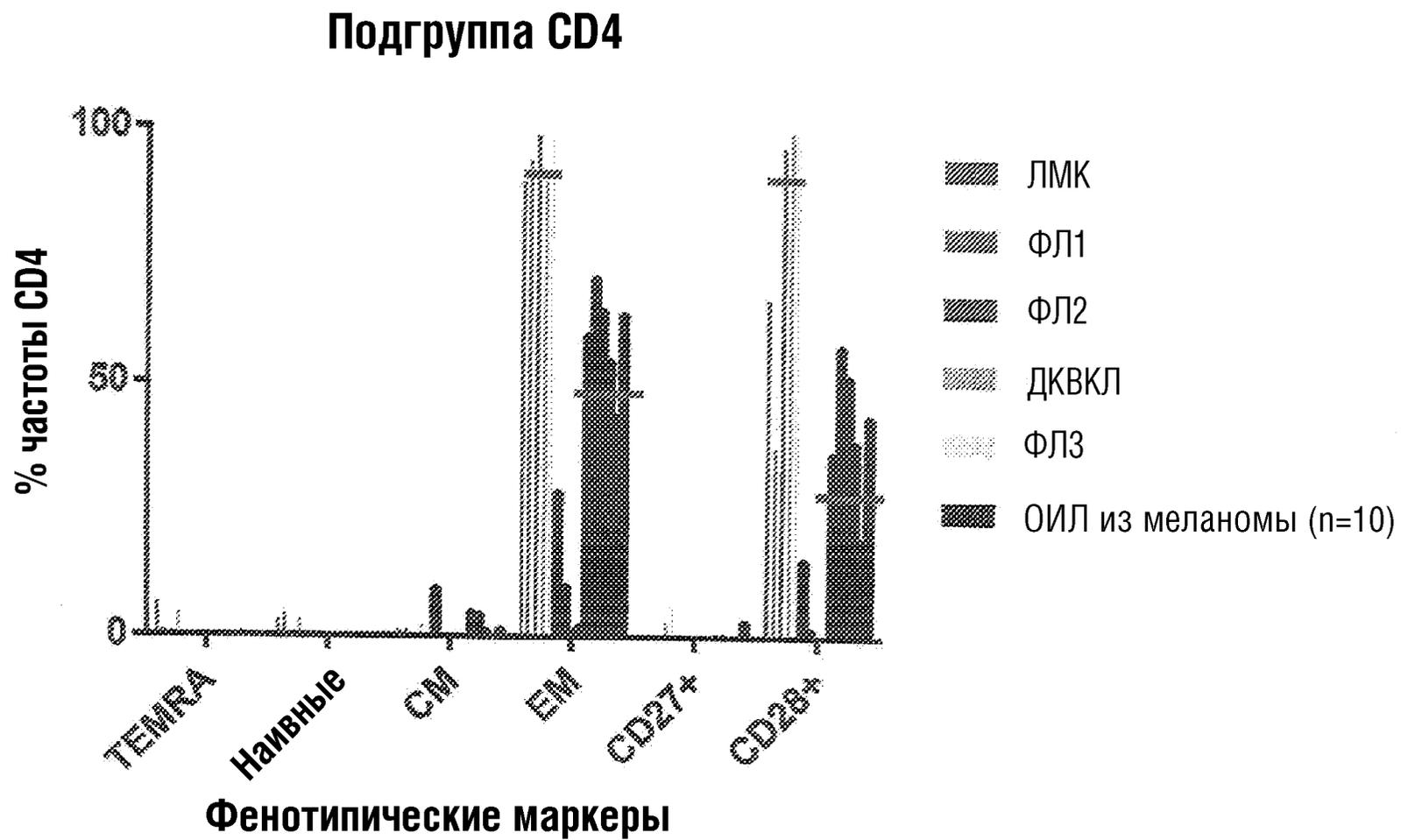
ФИГ.3



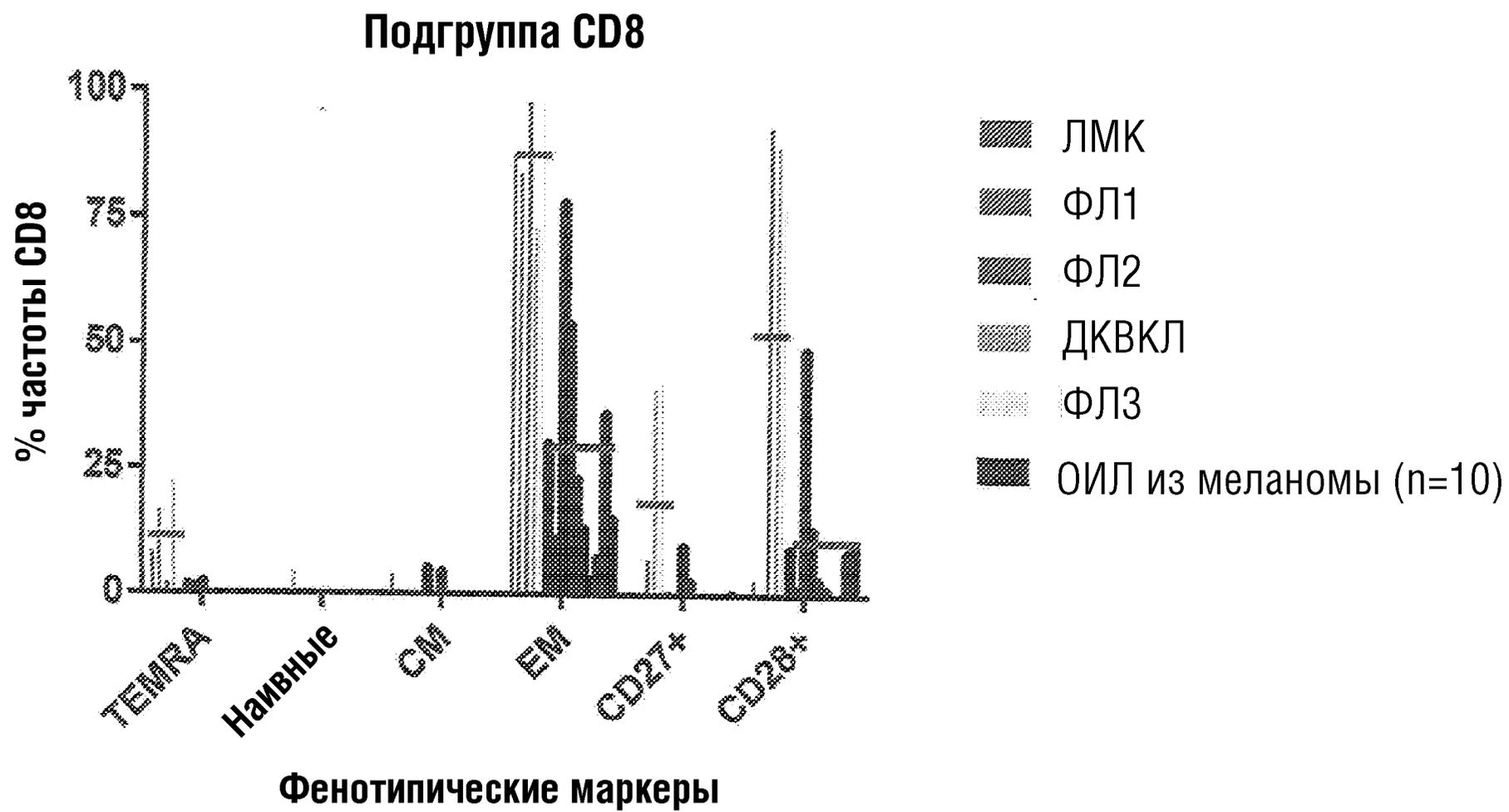
Подгруппа
CD4

Подгруппа
CD8

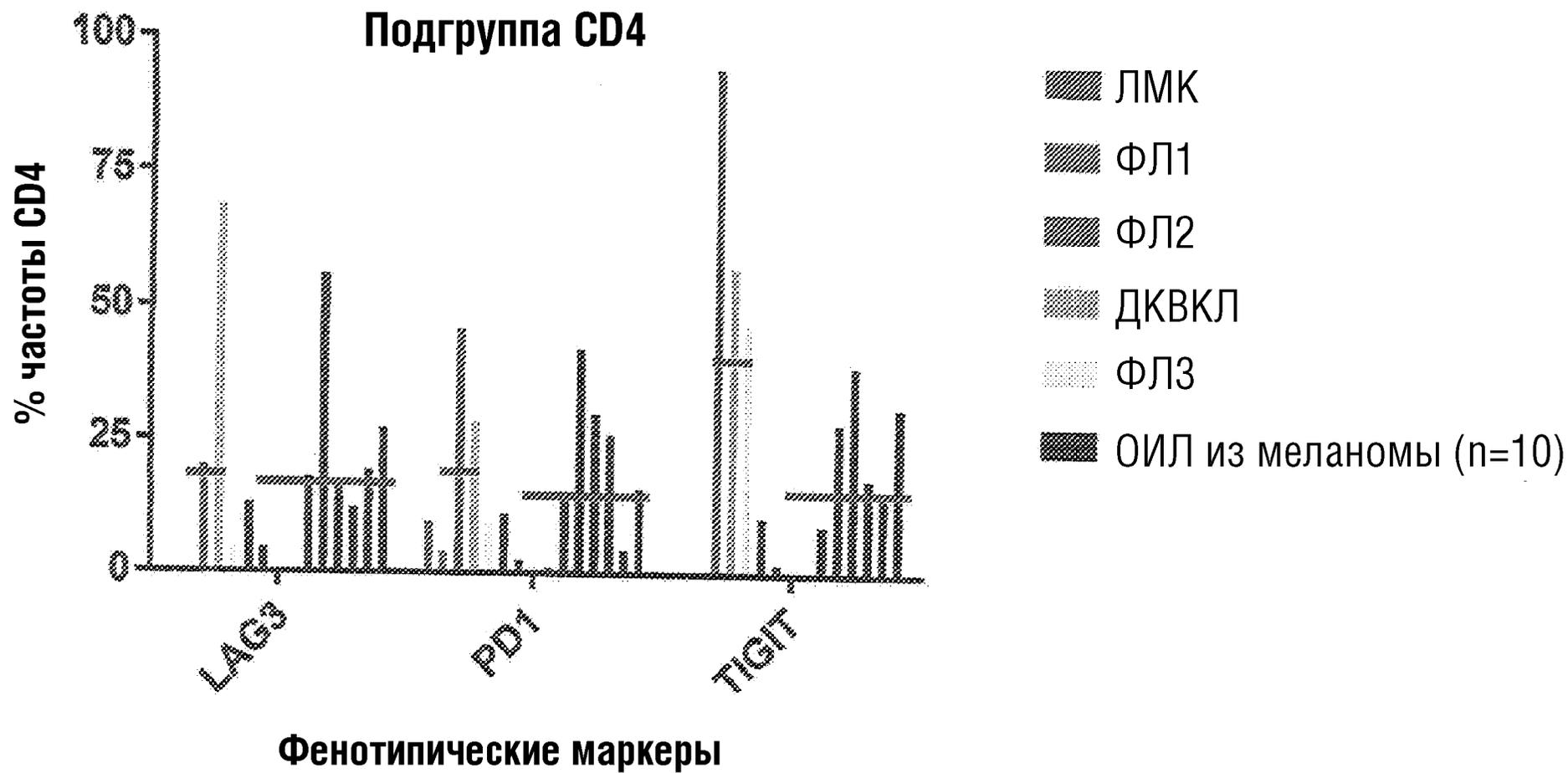
ФИГ.4



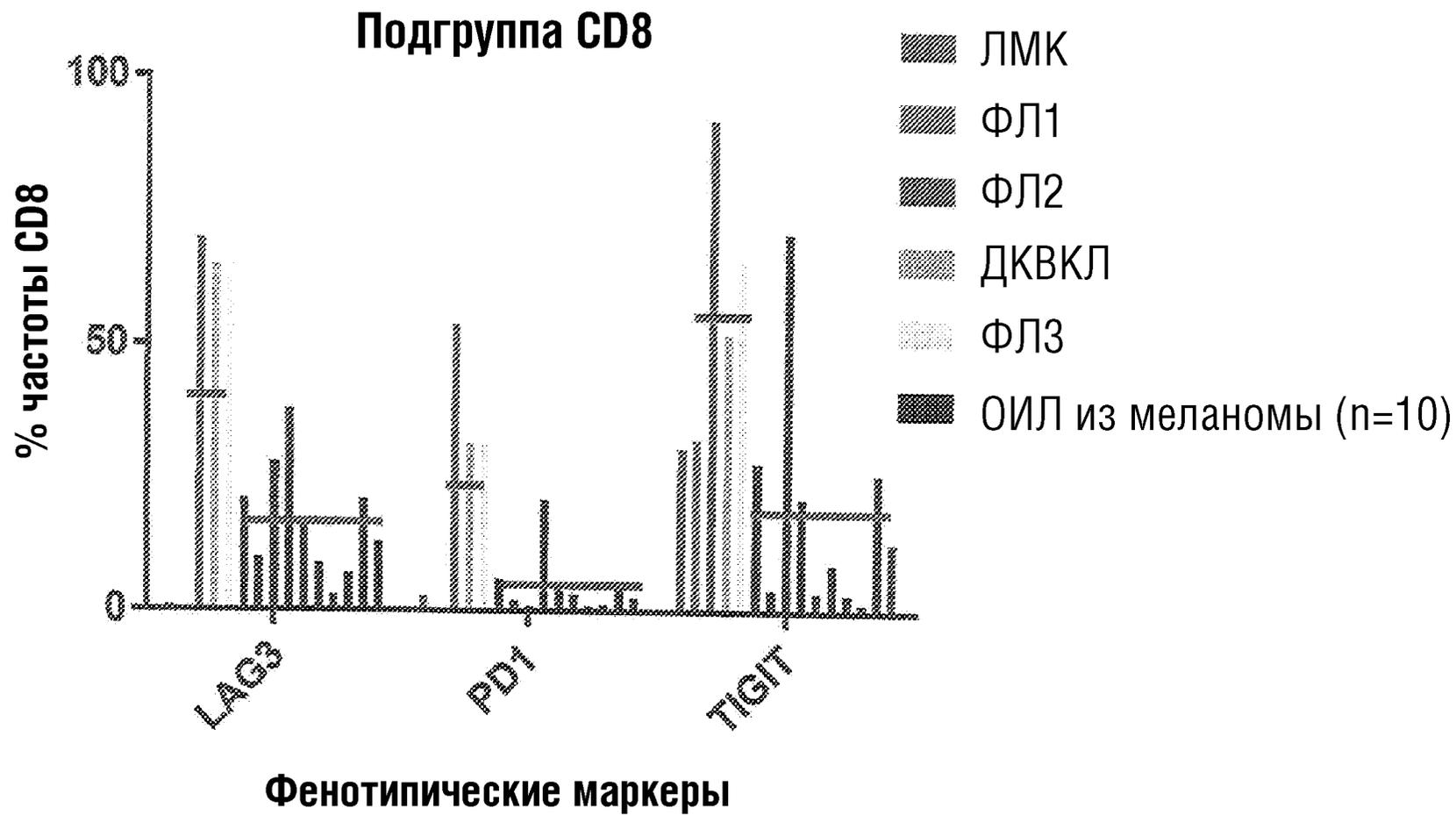
ФИГ.5



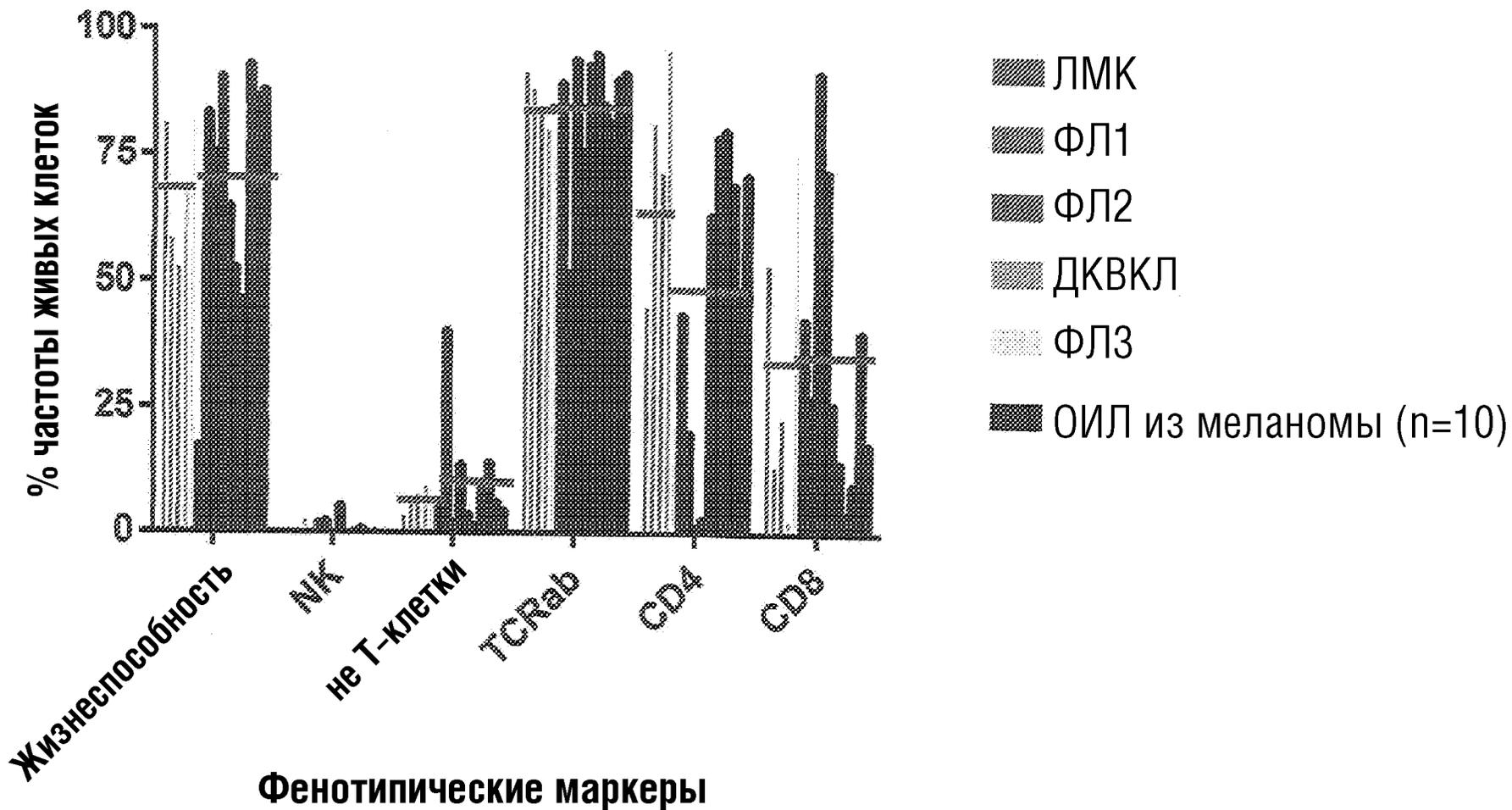
ФИГ.6



ФИГ.7



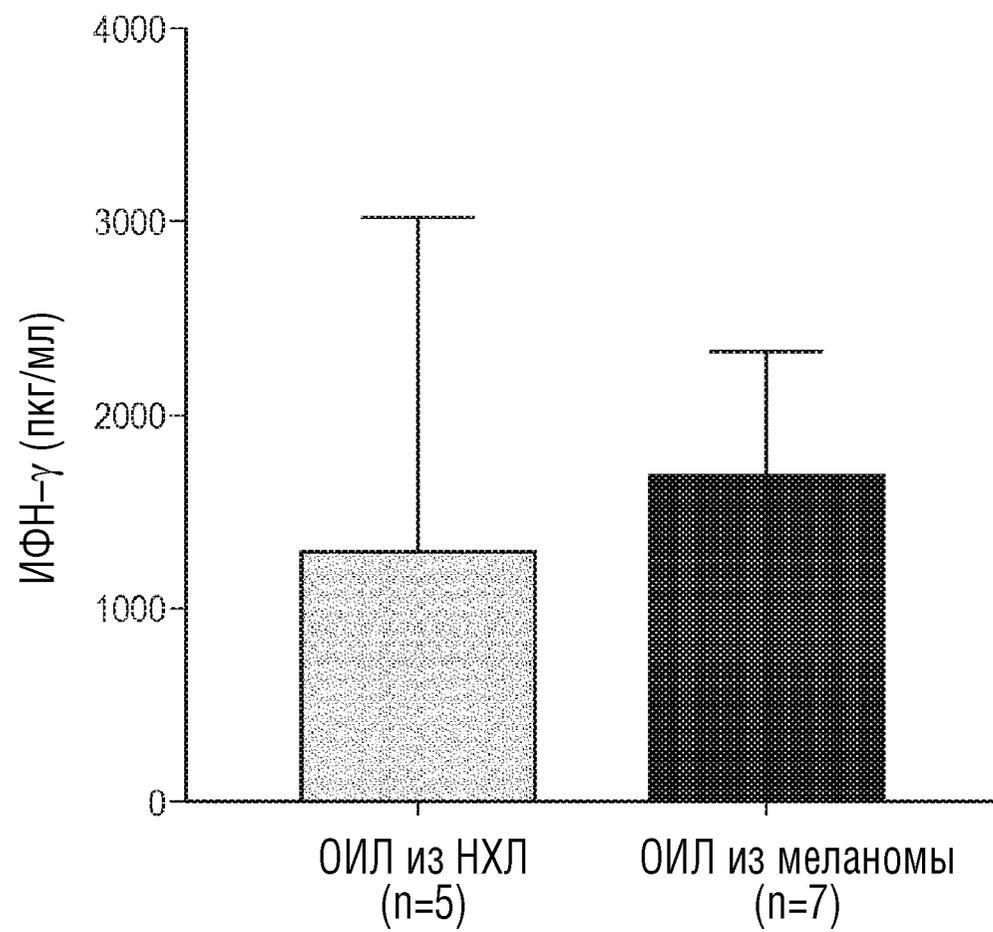
ФИГ.8



ФИГ.9

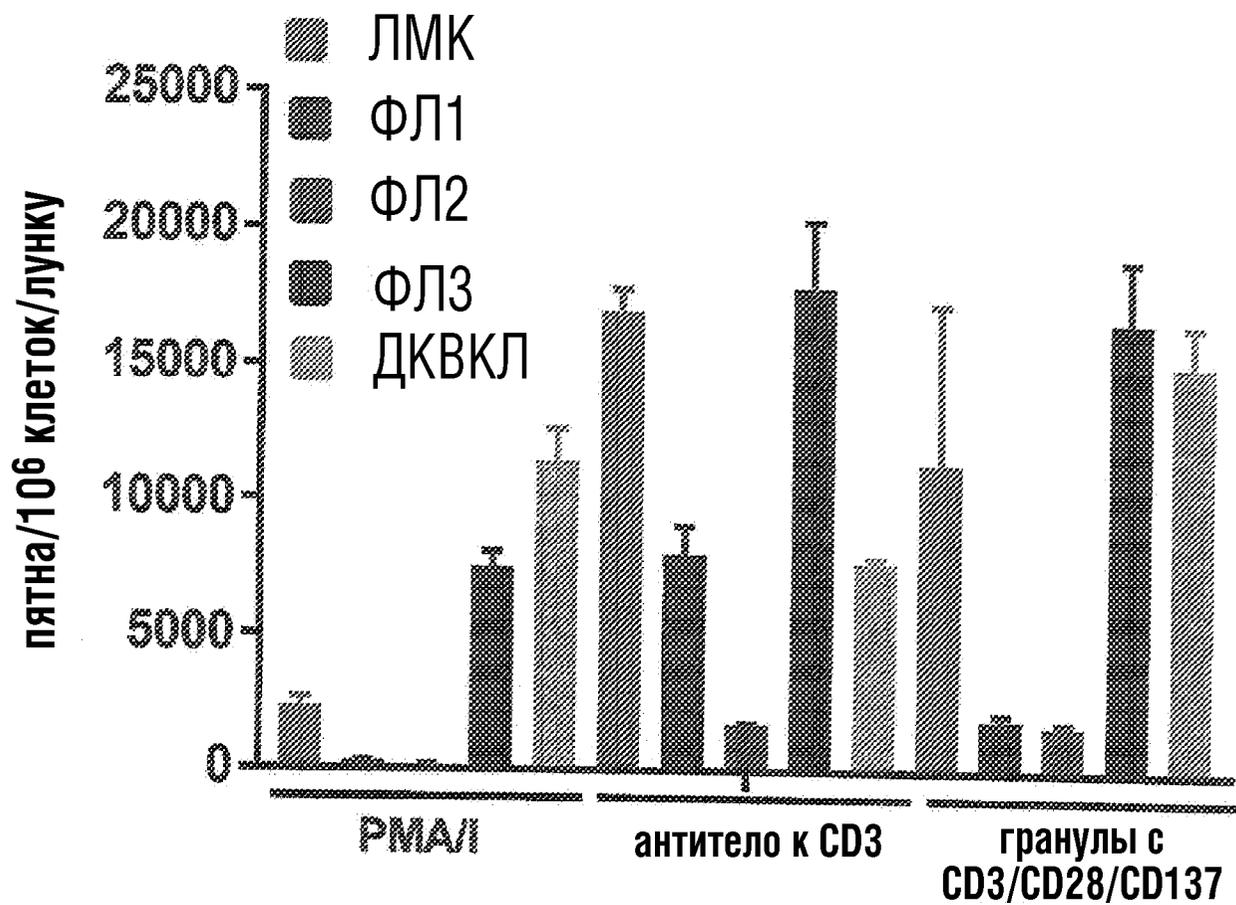
Тип ОИЛ		Исход	
		4 ч	24 ч
ОИЛ из меланомы	ОИЛ 1	100	100
	ОИЛ 2	100	100
	ОИЛ 3	100	100
	ОИЛ 4	100	100
	ОИЛ 5	100	100
	ОИЛ 6	100	100
	ОИЛ 7	100	100
ОИЛ из лимфомы	ОИЛ 1 (ЛМК)	100	100
	ОИЛ 2 (ФЛ)	100	100
	ОИЛ 3 (ФЛ)	100	100
	ОИЛ 4 (ФЛ)	100	100
	ОИЛ 5 (ДКВКЛ)	100	100

ФИГ.10

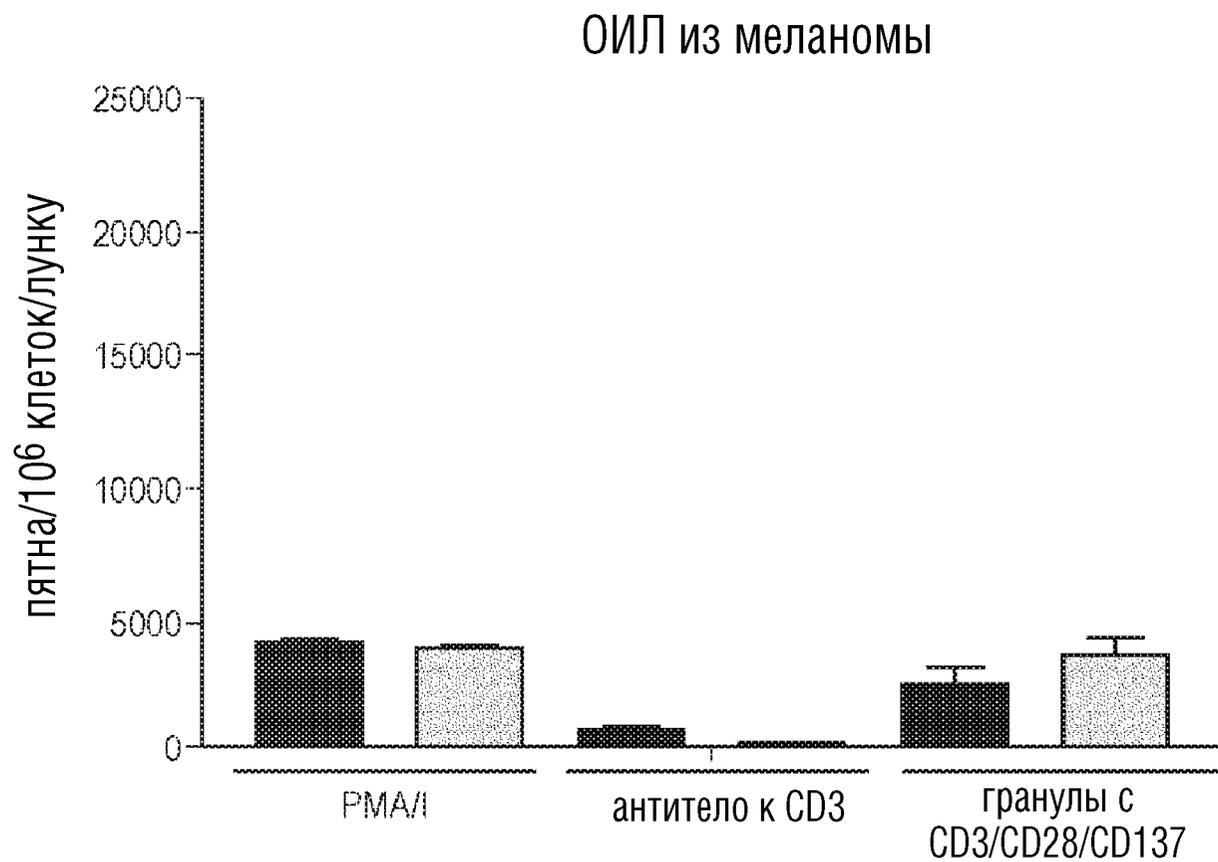


ФИГ.11

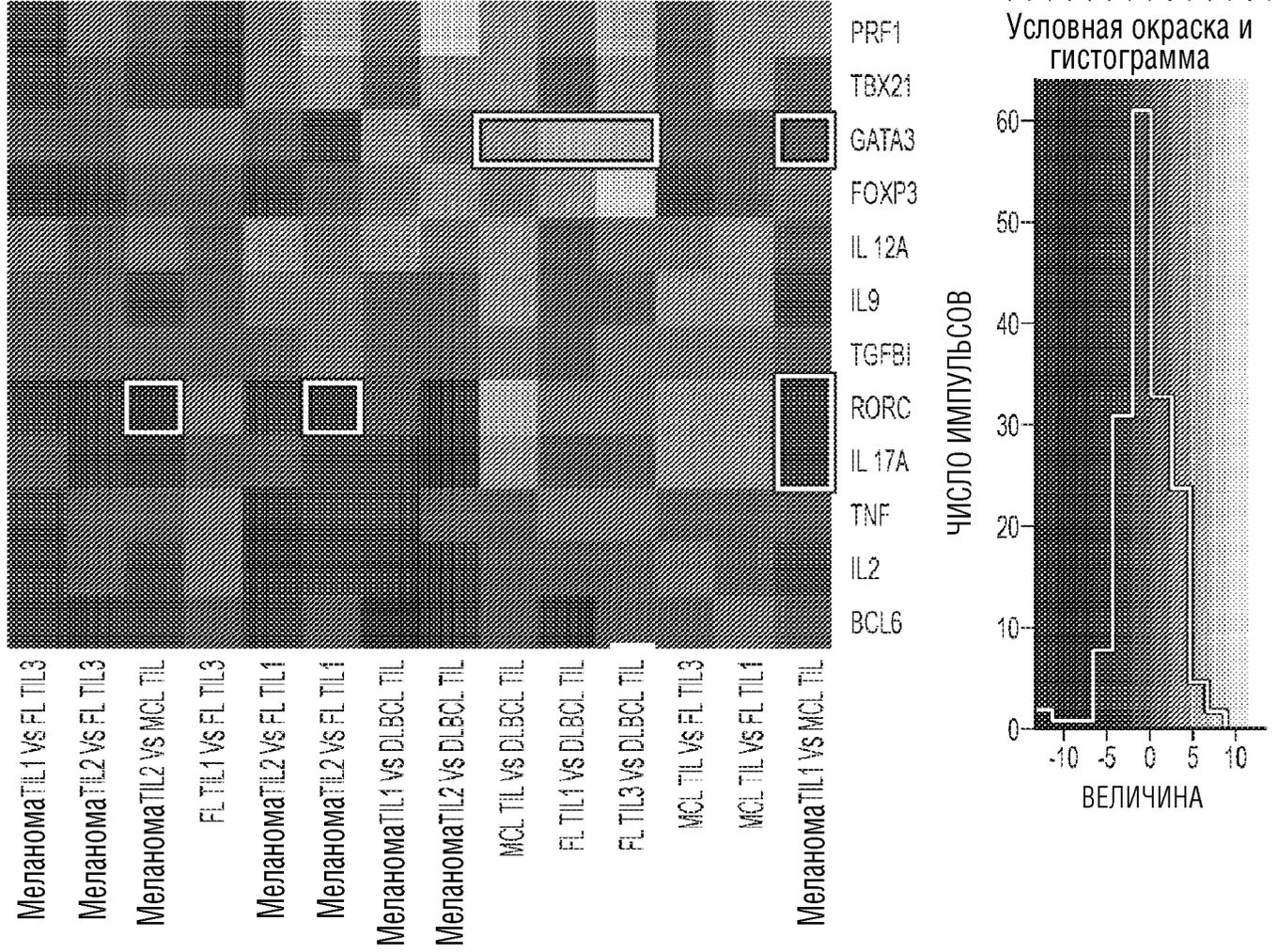
ОИЛ из лимфомы



ФИГ.12



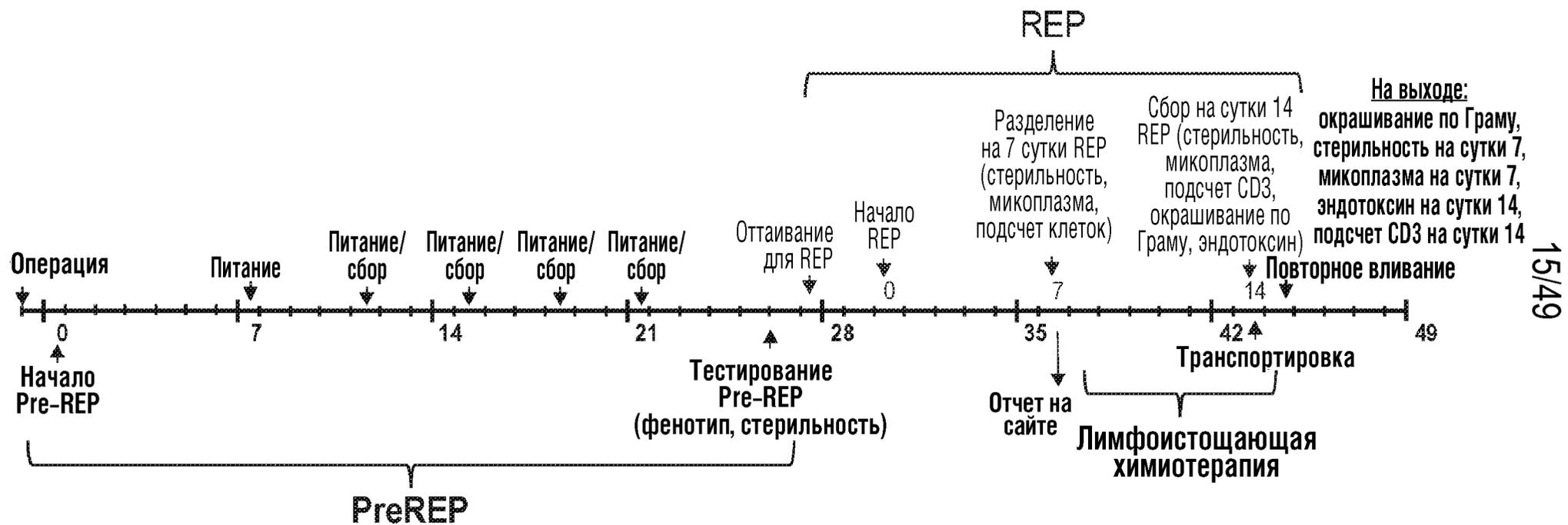
ФИГ.13



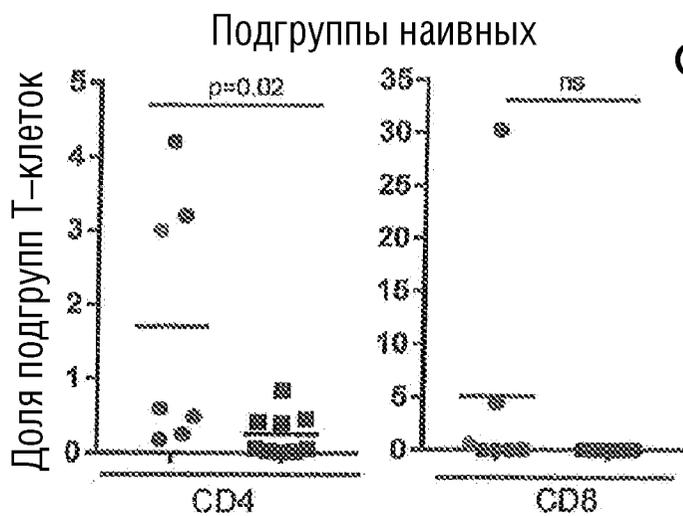
ФИГ.14



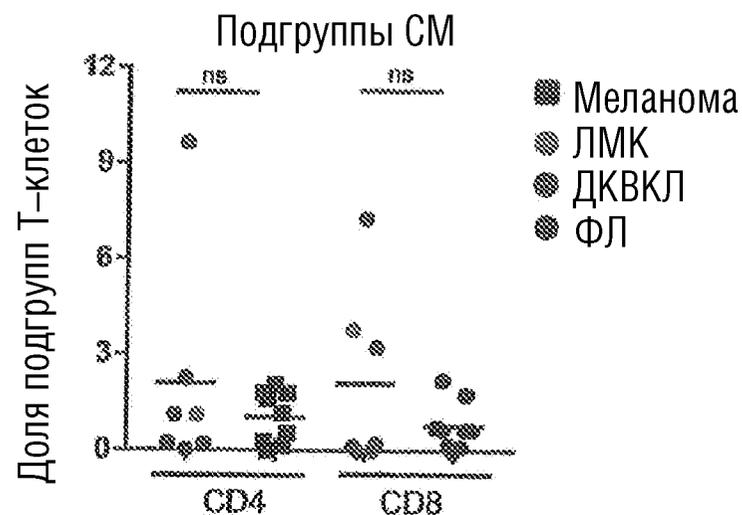
ФИГ.15



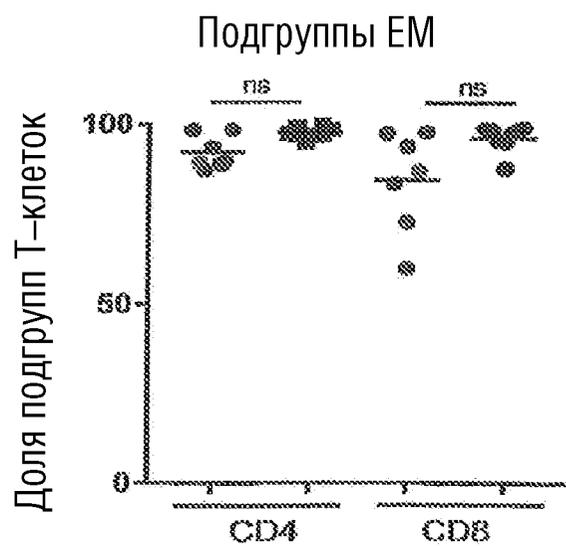
ФИГ.16А



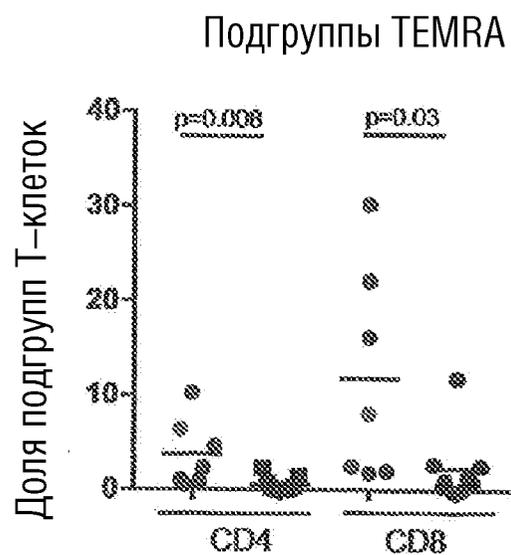
ФИГ.16В



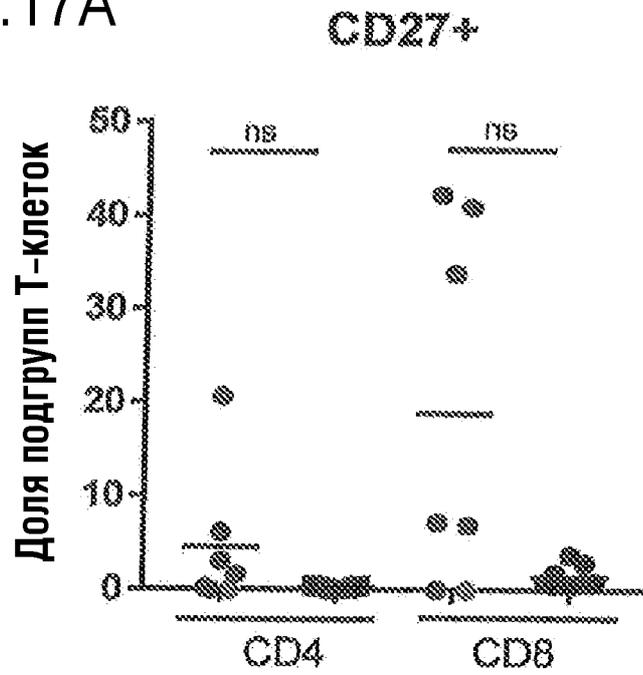
ФИГ.16С



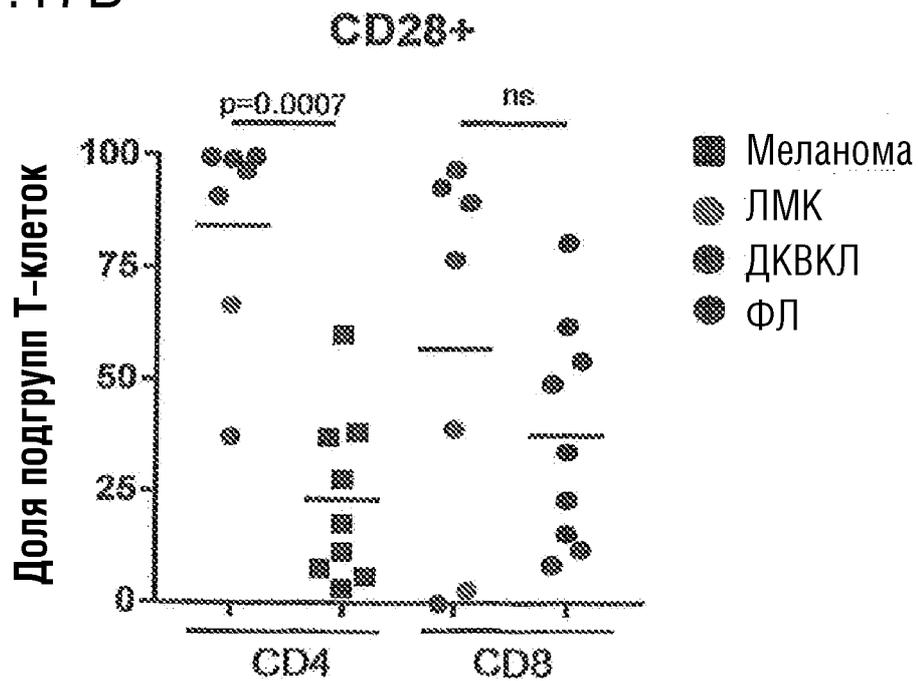
ФИГ.16D



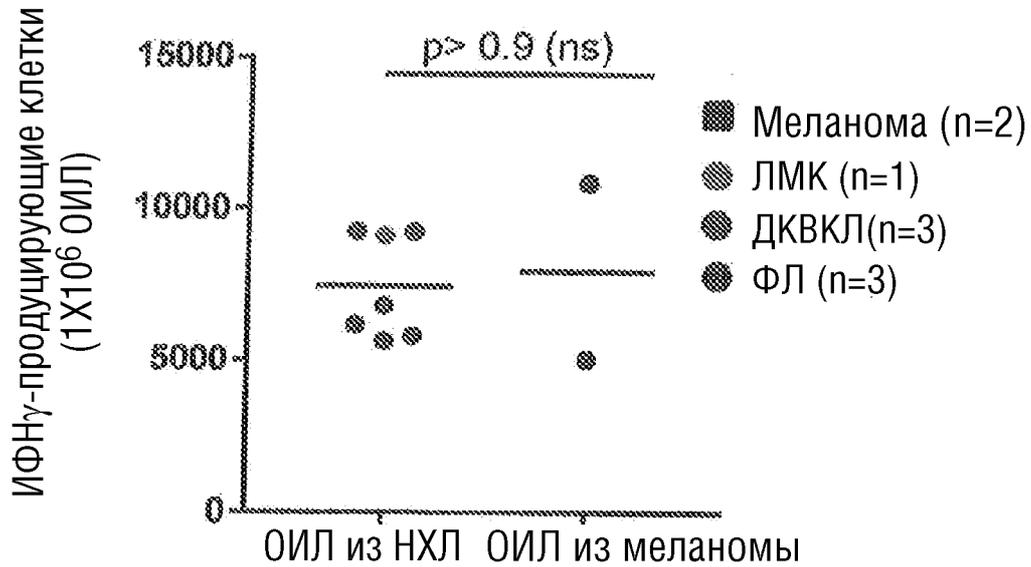
ФИГ.17А



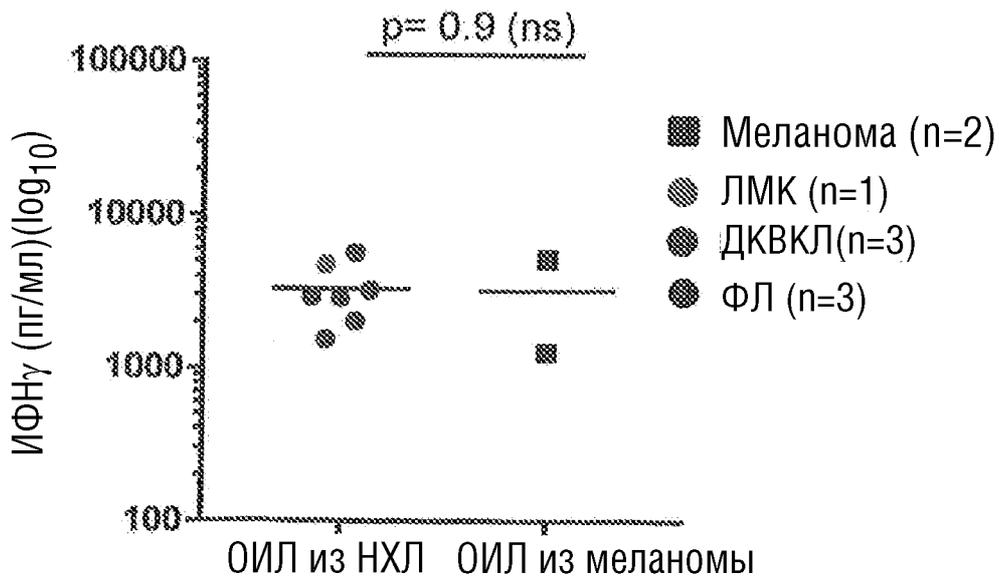
ФИГ.17В



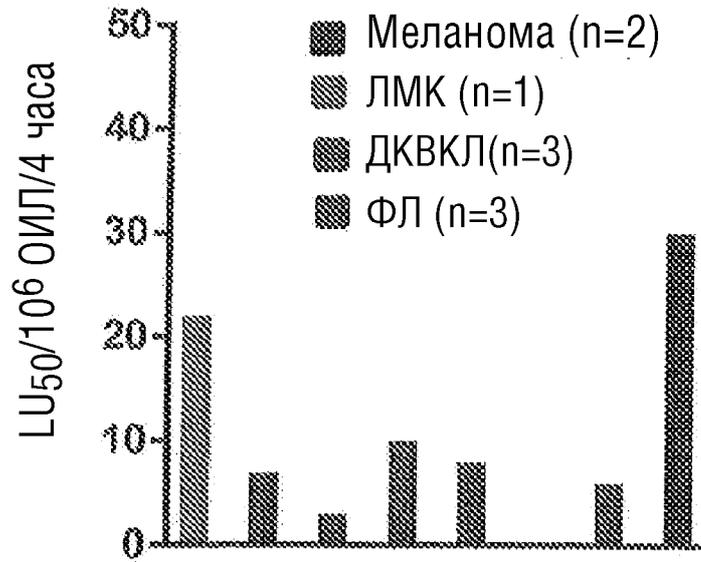
ФИГ.18А



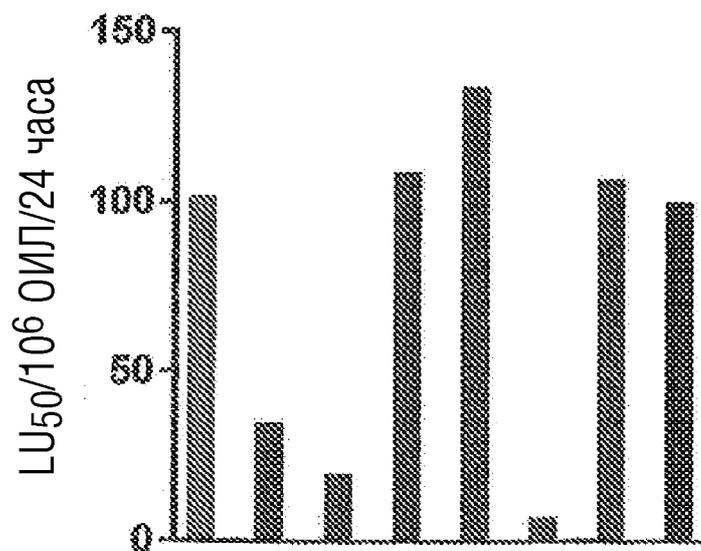
ФИГ.18В



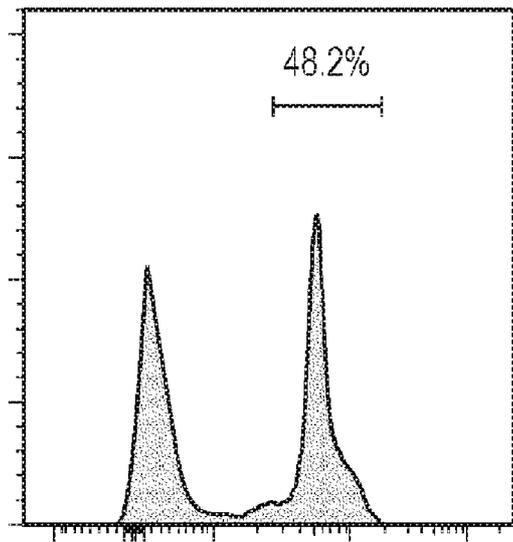
ФИГ.19А



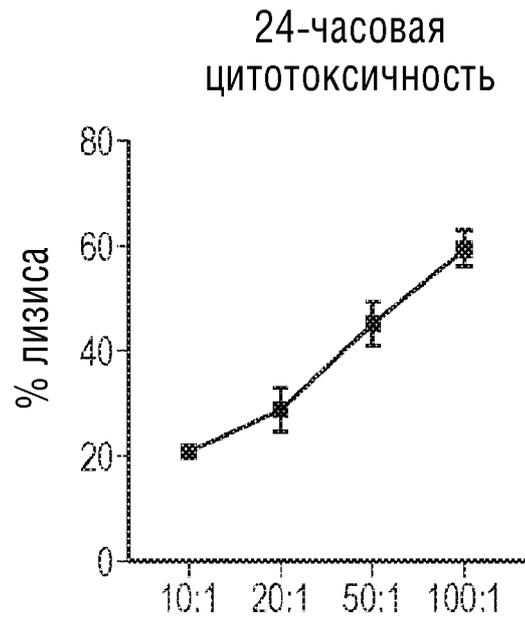
ФИГ.19В



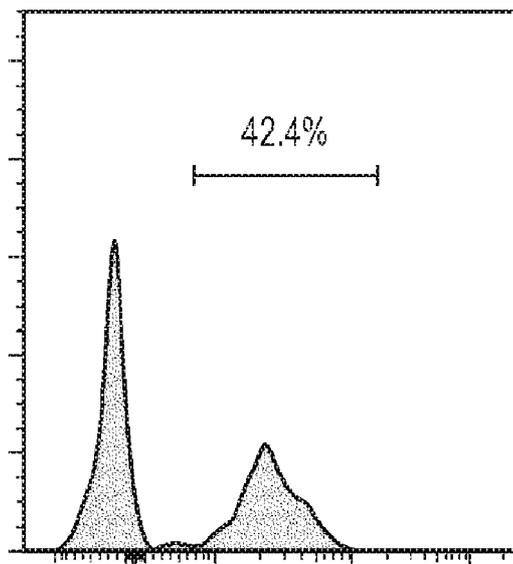
ФИГ.20А



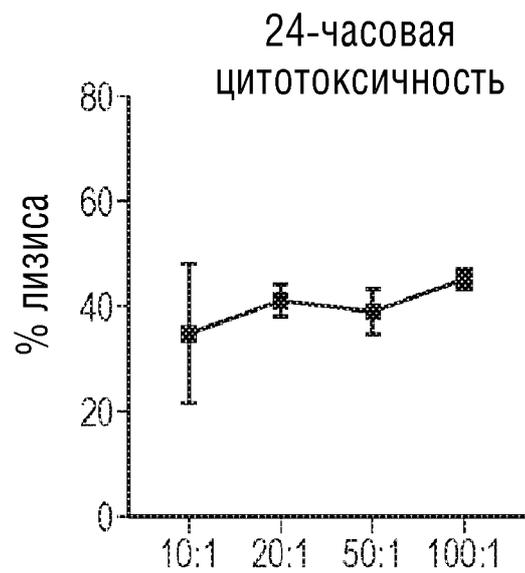
ФИГ.20В



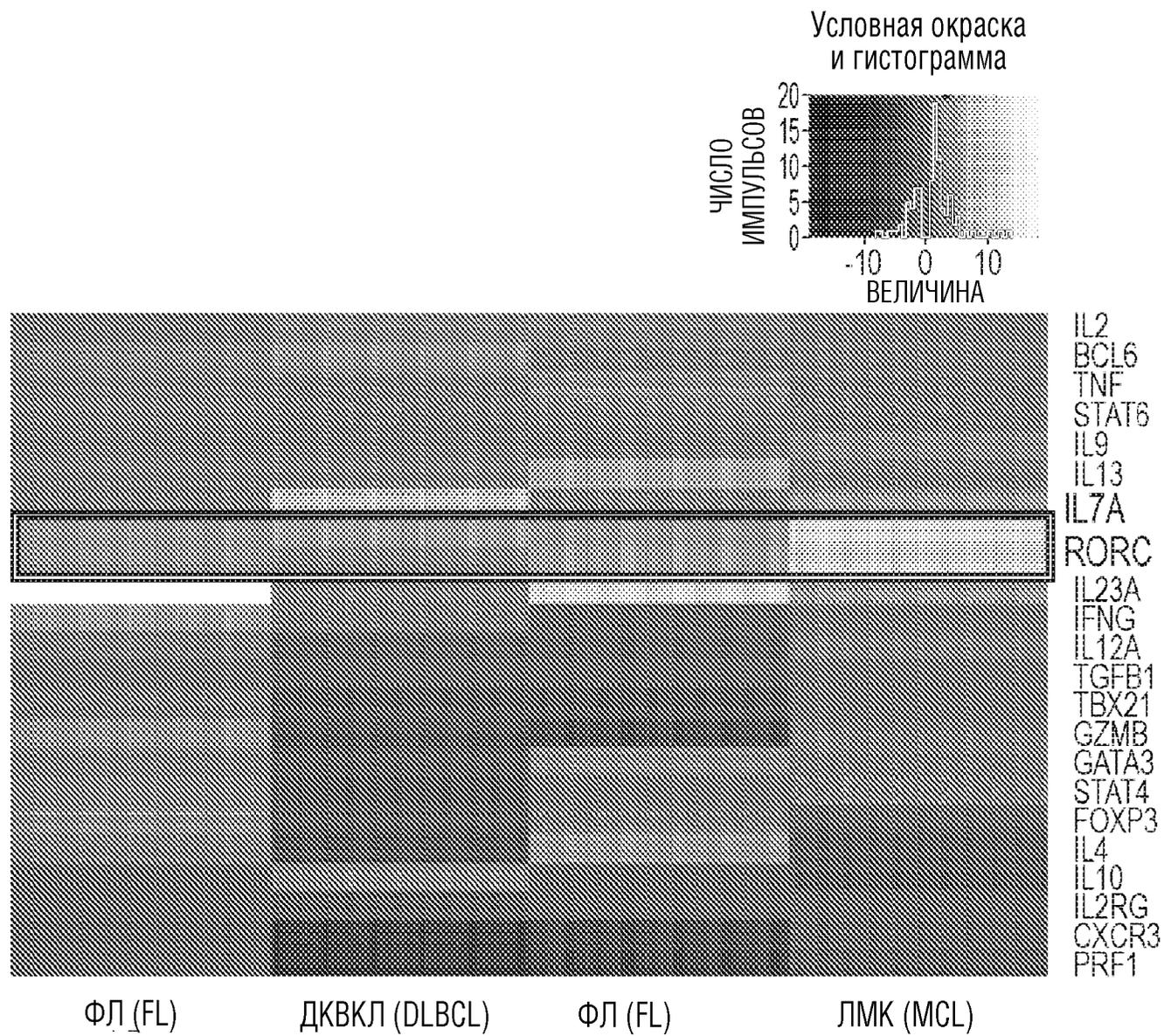
ФИГ.20С



ФИГ.20D

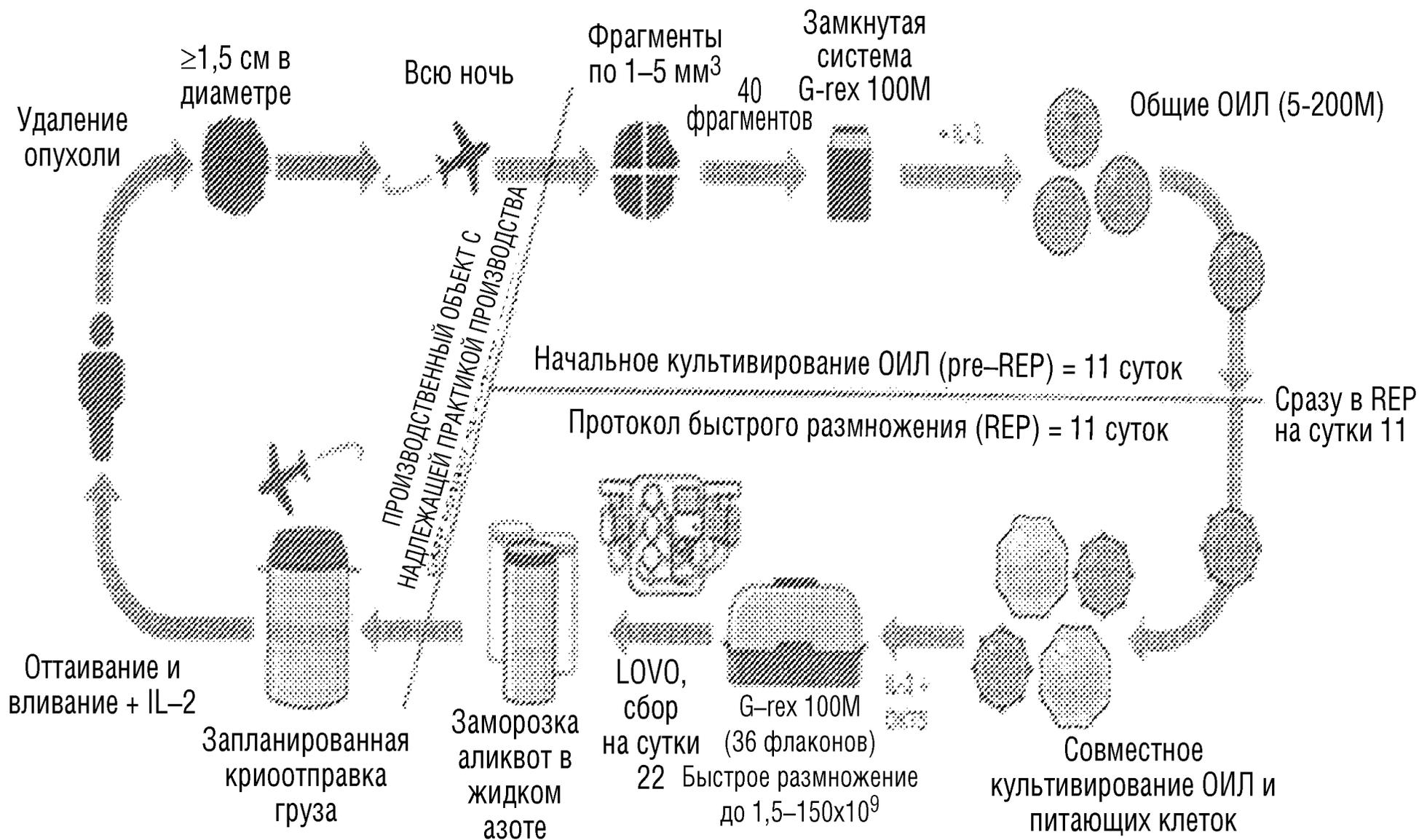


ФИГ.21



ФИГ.22

Способ 2А – 22 дня на способ, 2–3 дня на сбор и доставку



ФИГ.23

Способ 2А : приблизительно 22 суток на этапы А-Е

1. ЭТАП А

Получение образца опухоли пациента

2. ЭТАП В

Фрагментирование и первое размножение
от 3 суток до 14 суток

3. ЭТАП С

Переход от первого размножения ко второму
размножению
Без хранения и замкнутой системы

4. ЭТАП D

Второе размножение
IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие питающие клетки
Замкнутая система

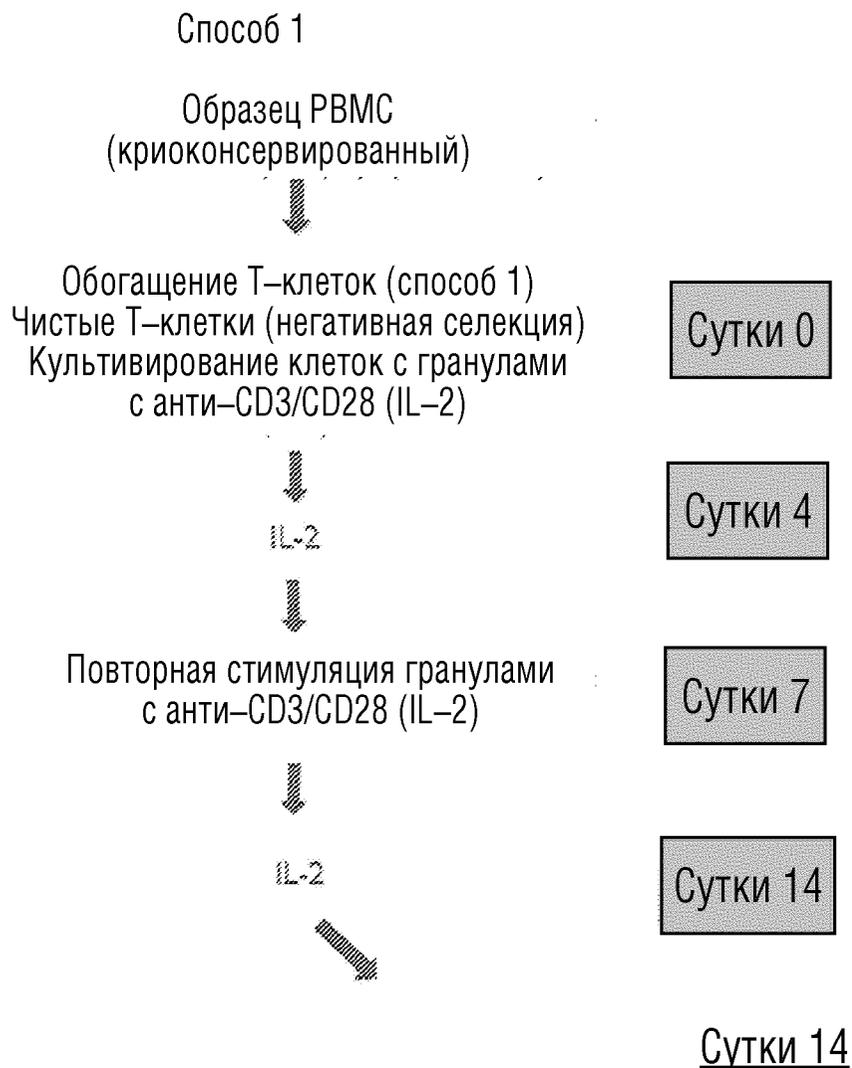
5. ЭТАП Е

Сбор ОИЛ с Этапа D
Замкнутая система

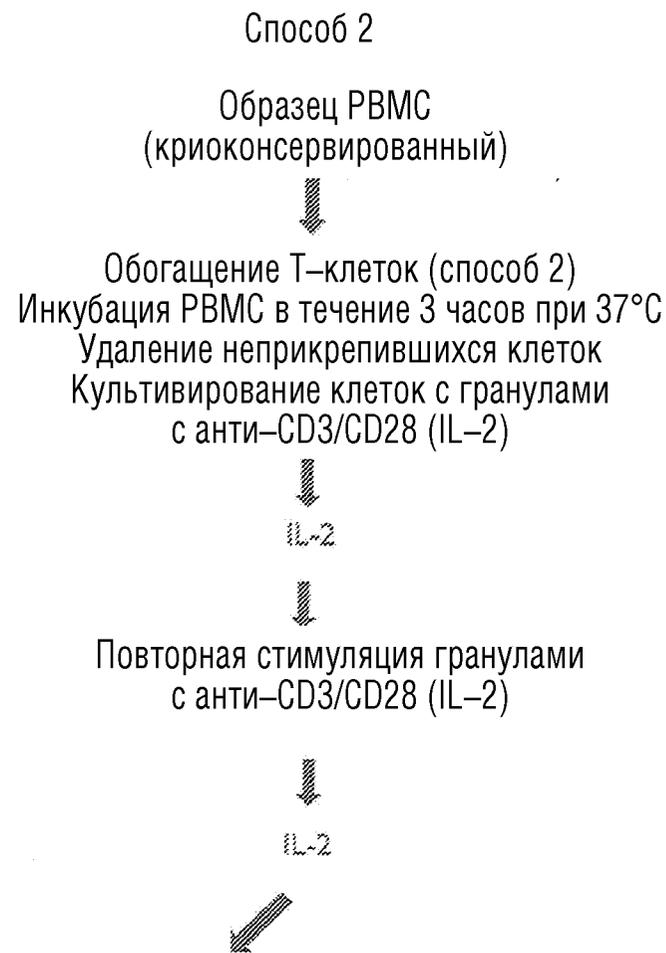
6. ЭТАП F

Окончательное формулирование в продукт и перенос в
пакет для инфузий (по желанию криоконсервирование)

ФИГ.24А

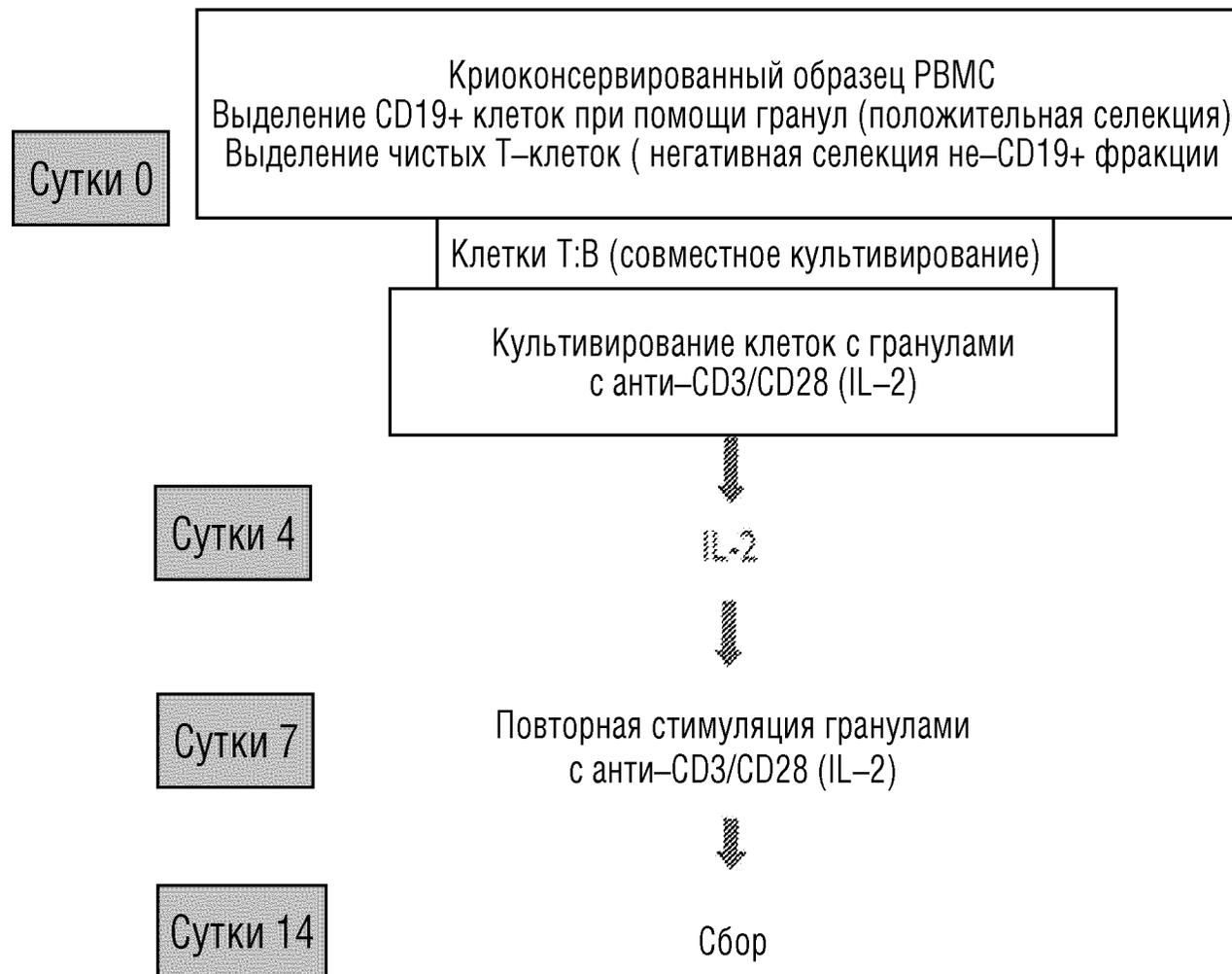


ФИГ.24В



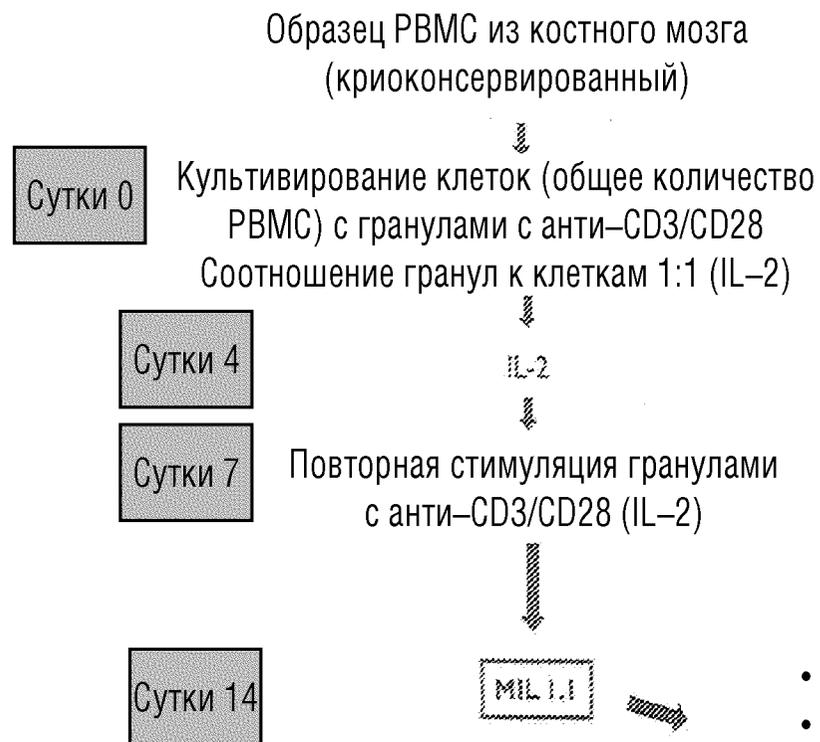
ФИГ.24С

Способ 3



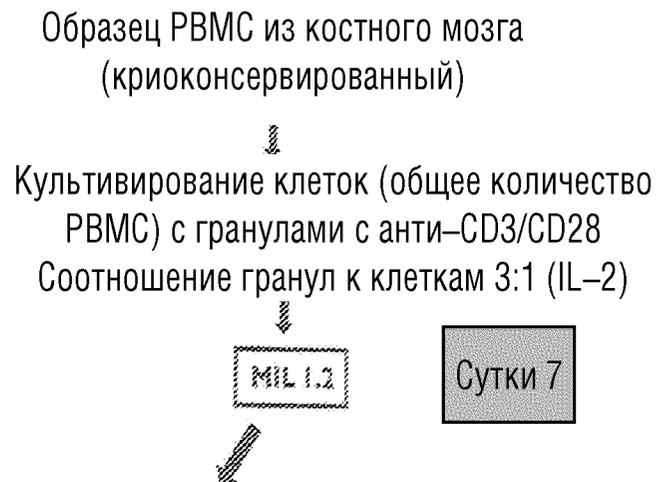
ФИГ.25А

Способ 1



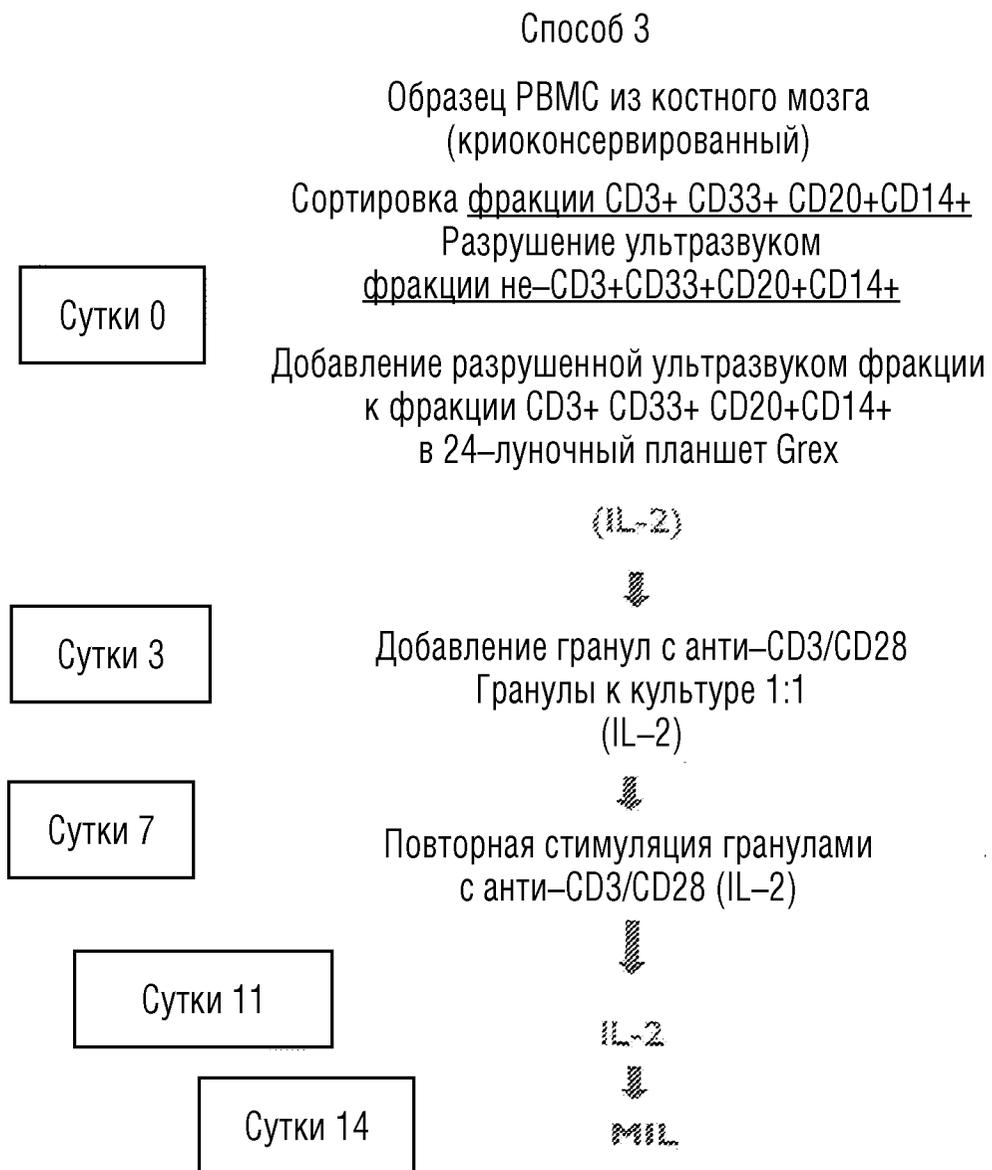
ФИГ.25В

Способ 2

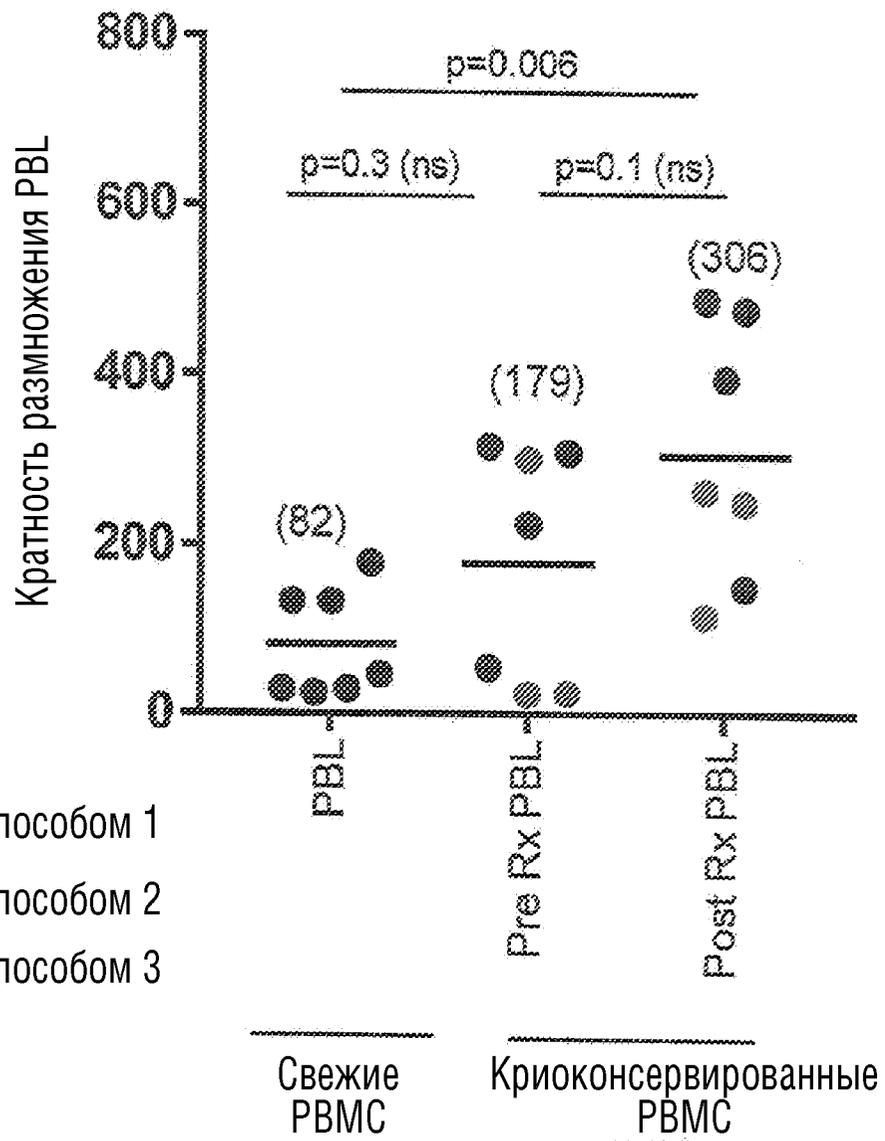


- Сбор клеток
- Удаление гранул
- Подсчет клеток
- Фенотипический и функциональный анализ

ФИГ.25С

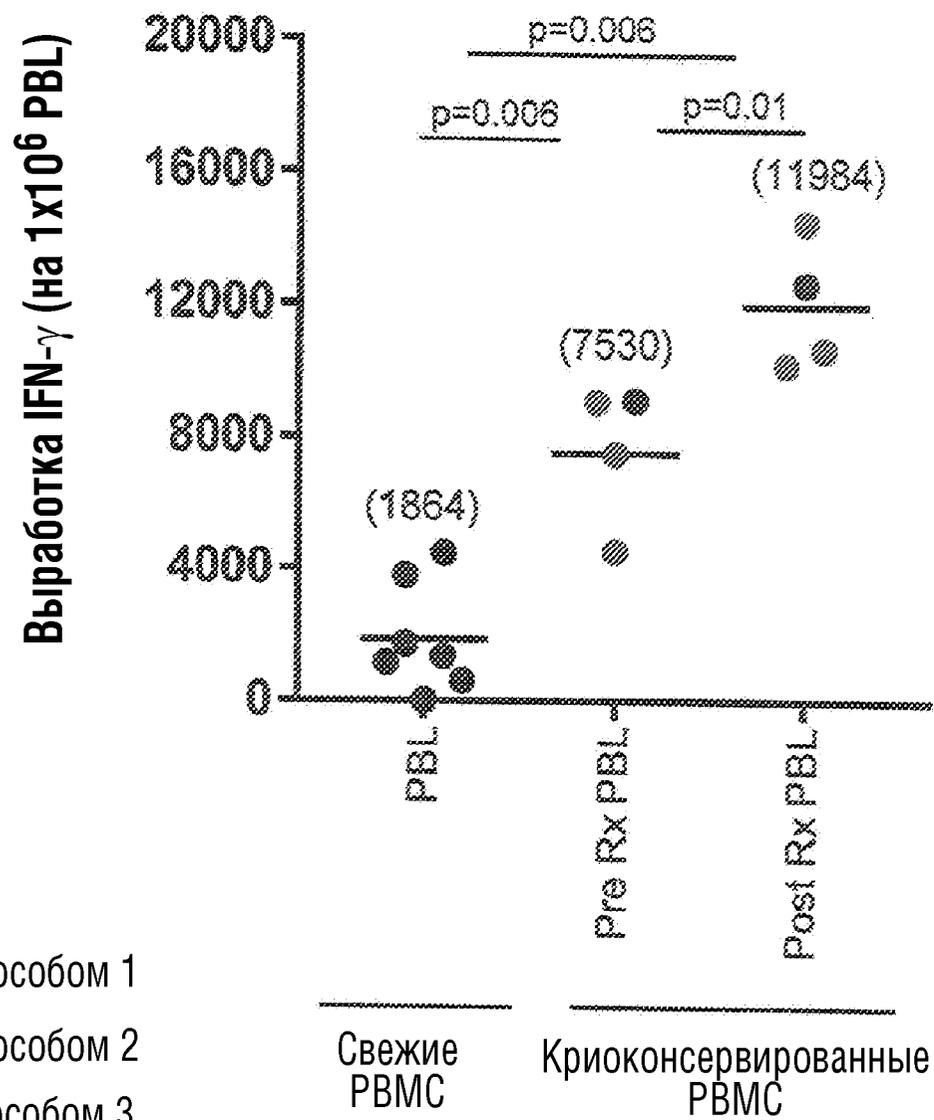


ФИГ.26



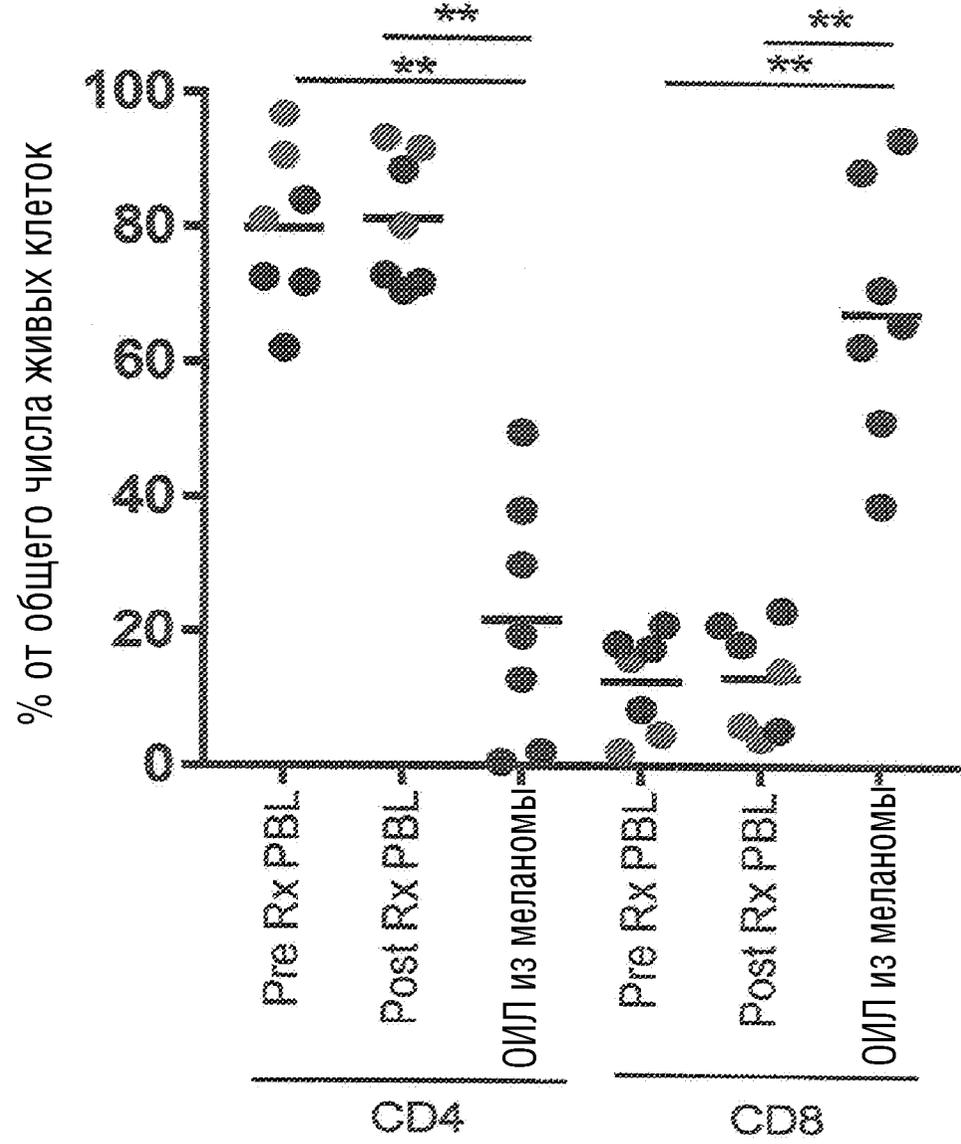
- ▨ PBL, размноженные способом 1
- ▩ PBL, размноженные способом 2
- PBL, размноженные способом 3

ФИГ.27

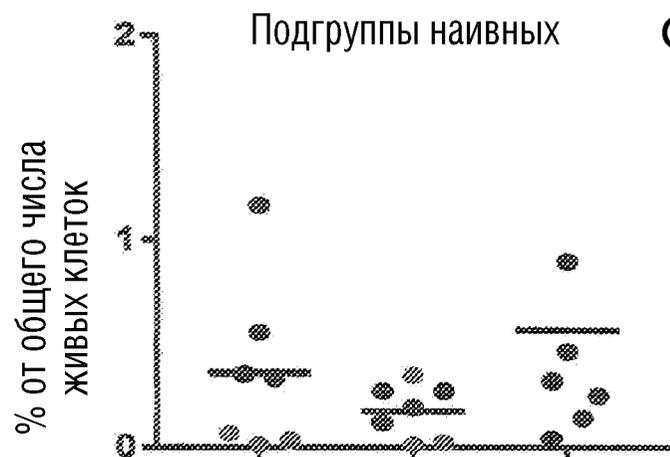


- PBL, размноженные способом 1
- PBL, размноженные способом 2
- PBL, размноженные способом 3

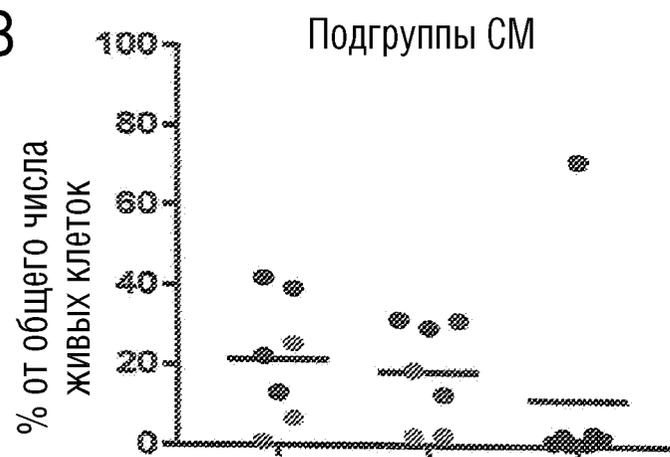
ФИГ.28



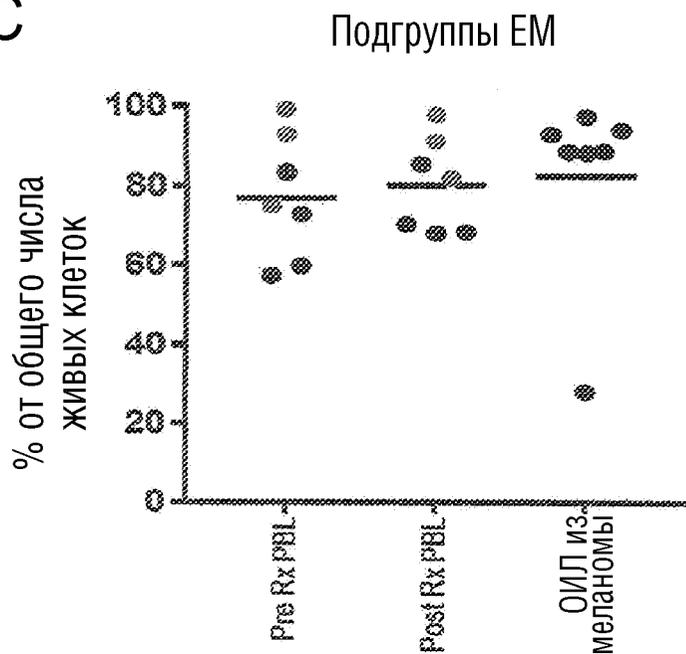
ФИГ.29А



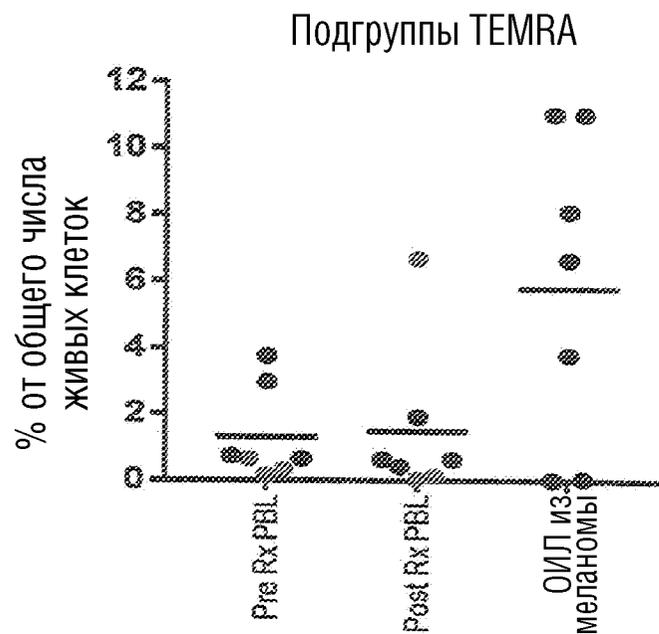
ФИГ.29В



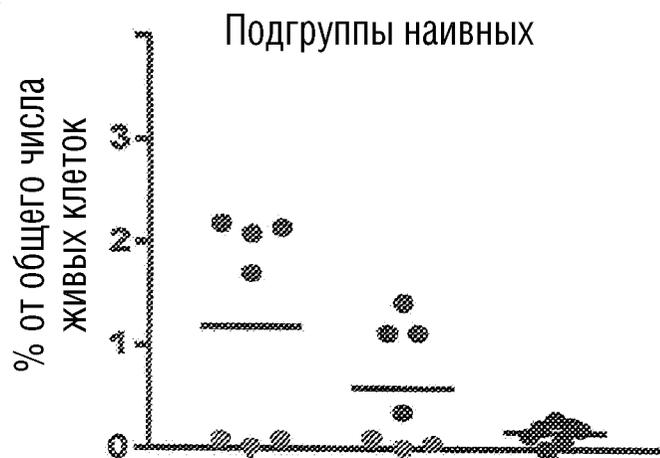
ФИГ.29С



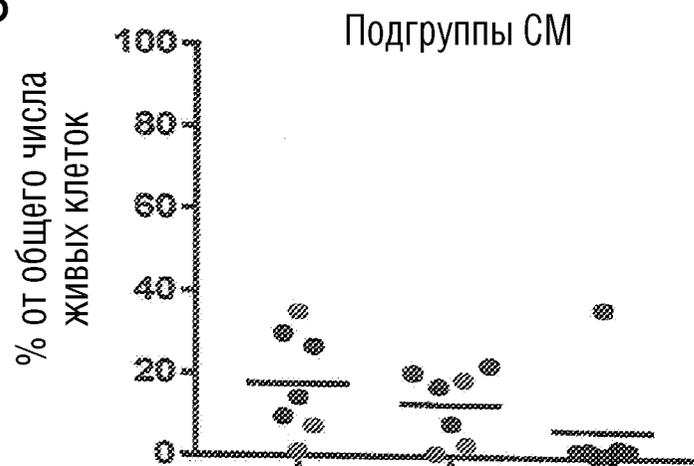
ФИГ.29D



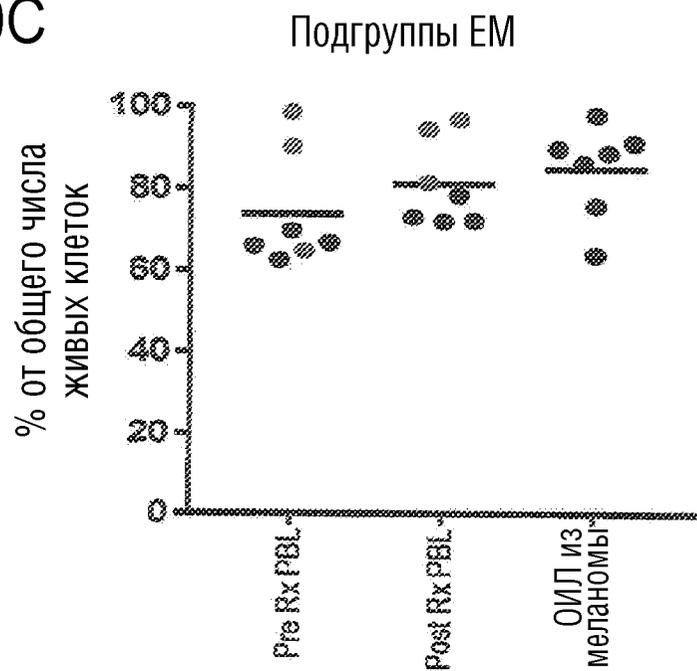
ФИГ.30А



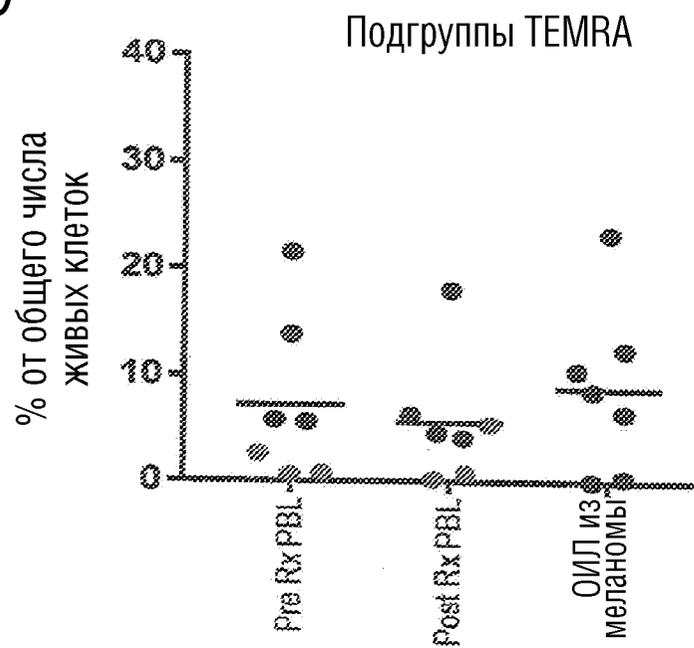
ФИГ.30В



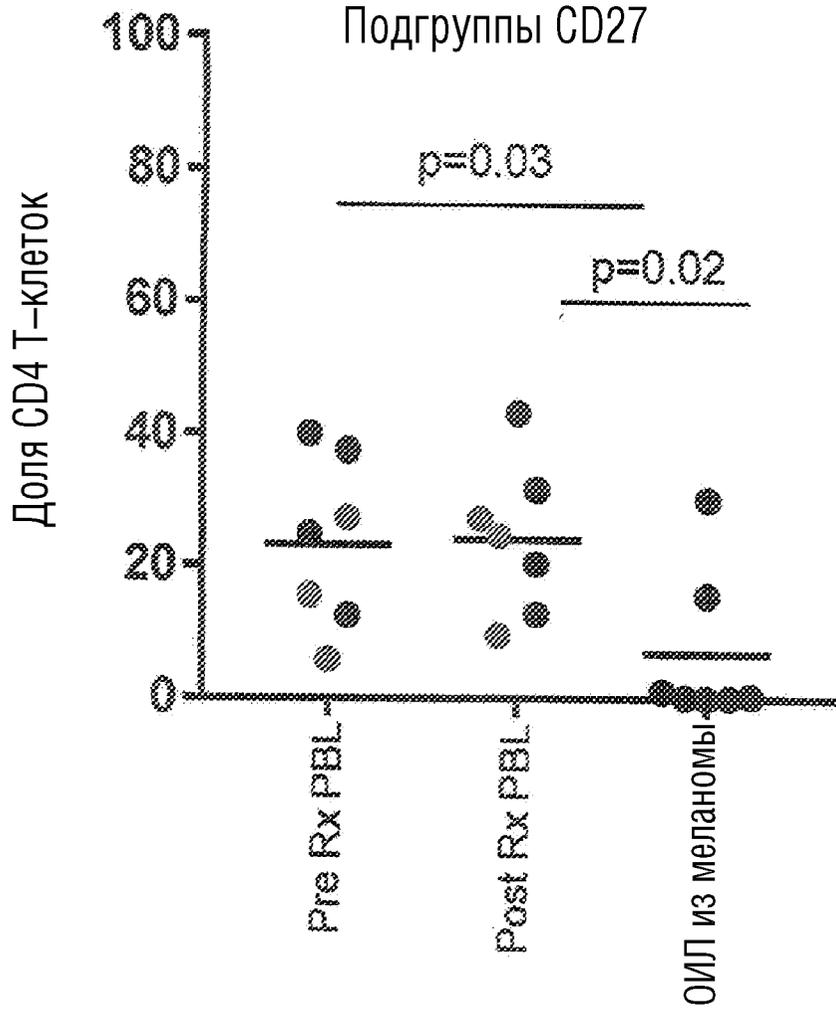
ФИГ.30С



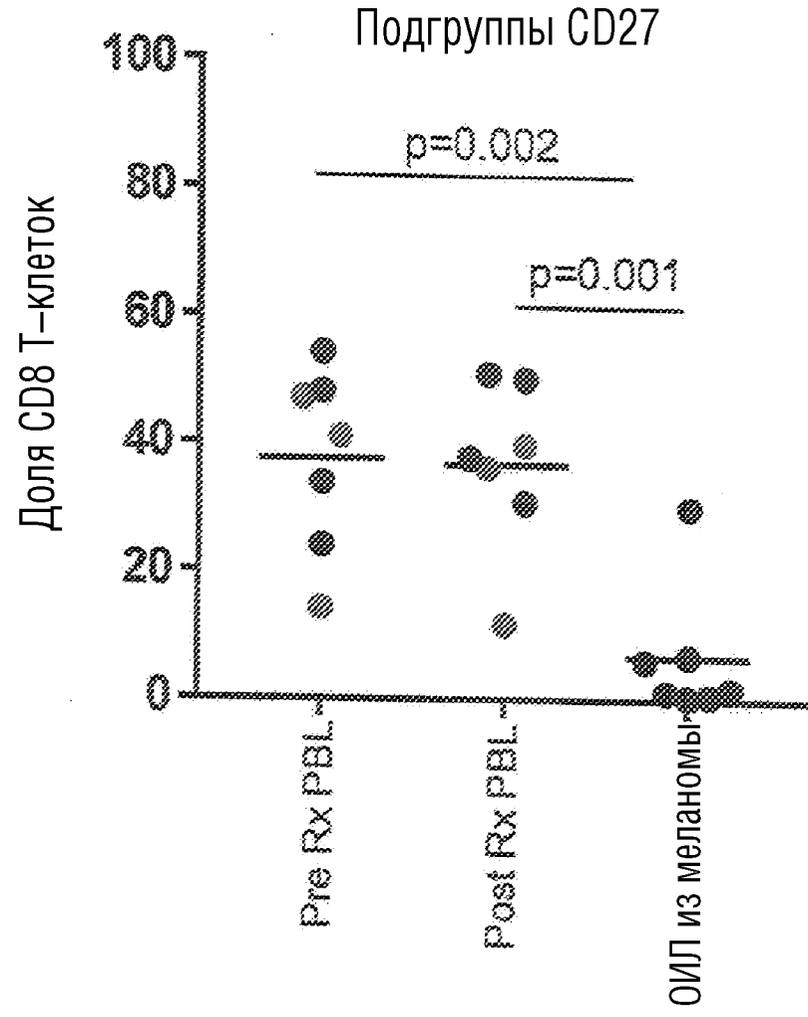
ФИГ.30D



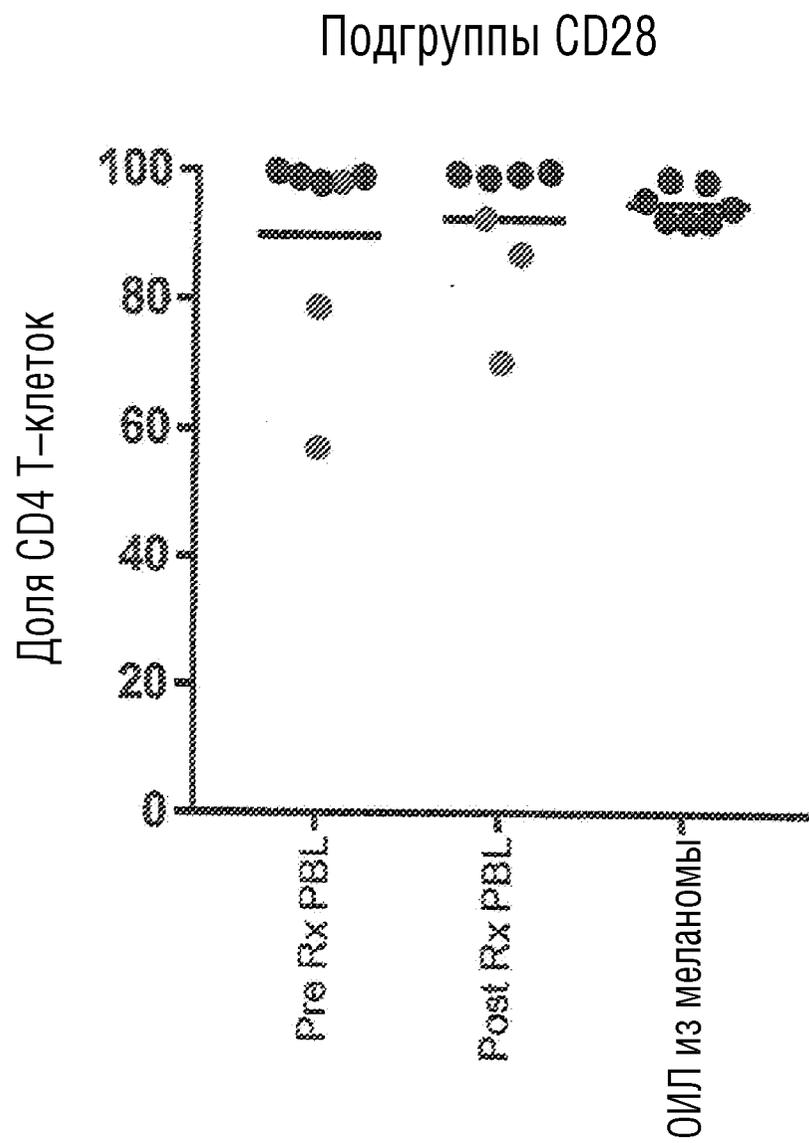
ФИГ.31А



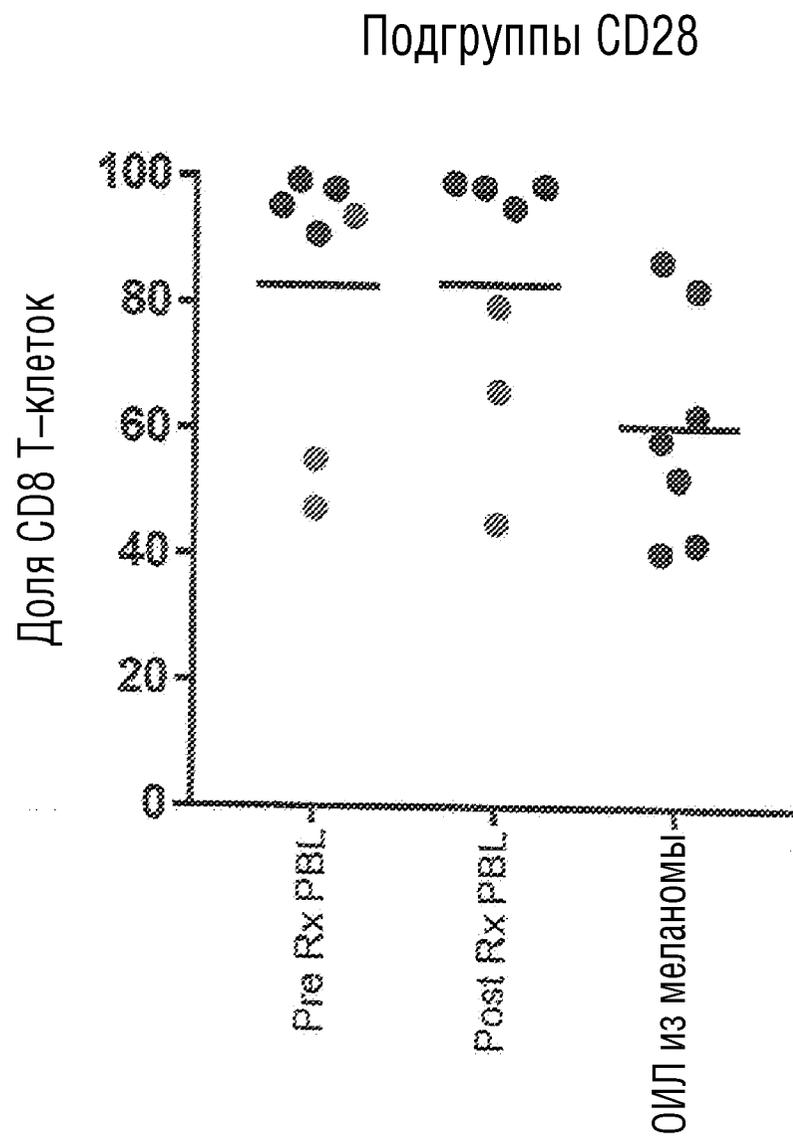
ФИГ.31В



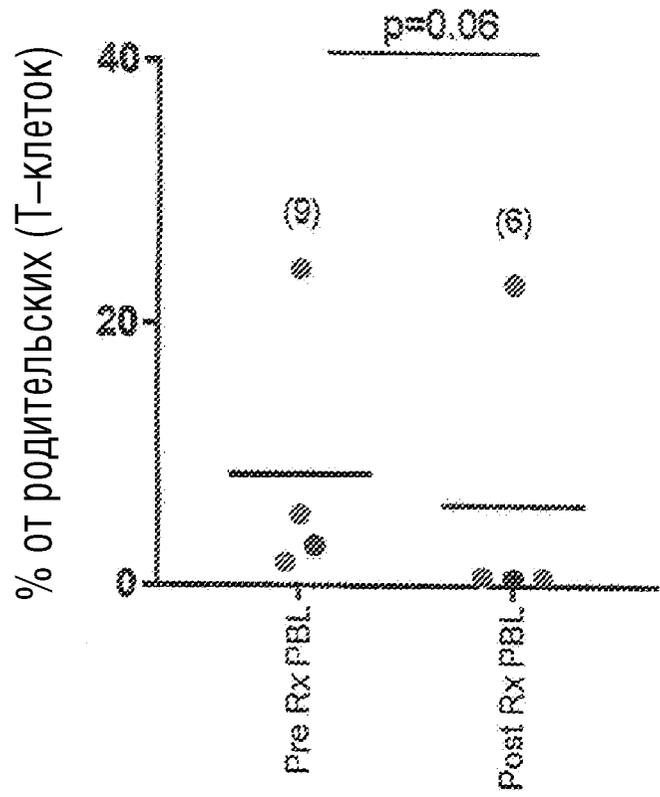
ФИГ.32А



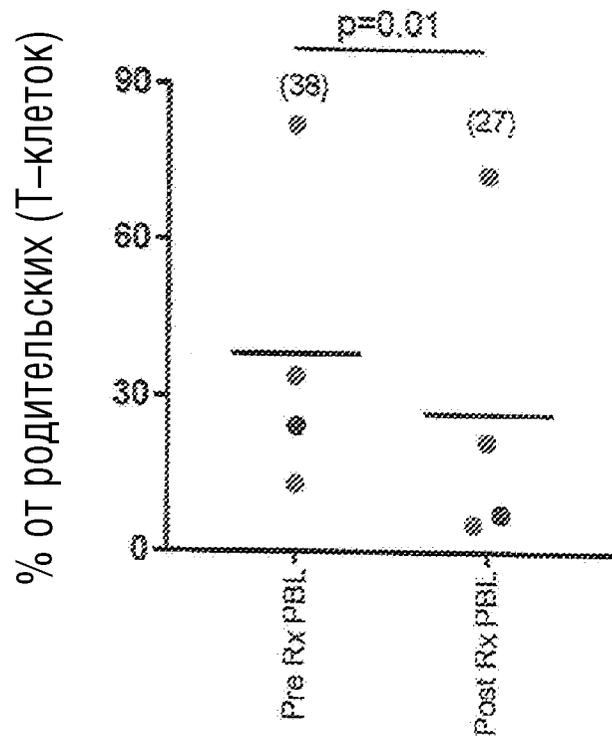
ФИГ.32В



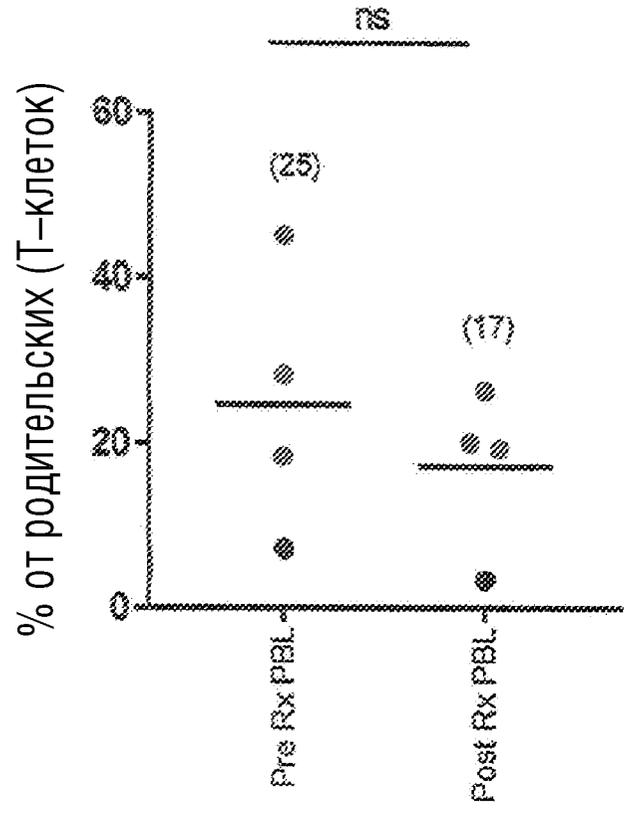
ФИГ.33А



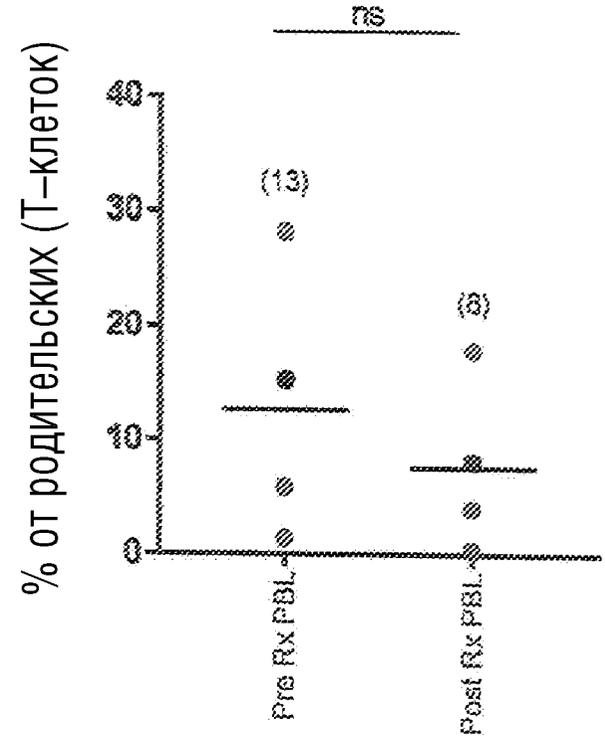
ФИГ.33В



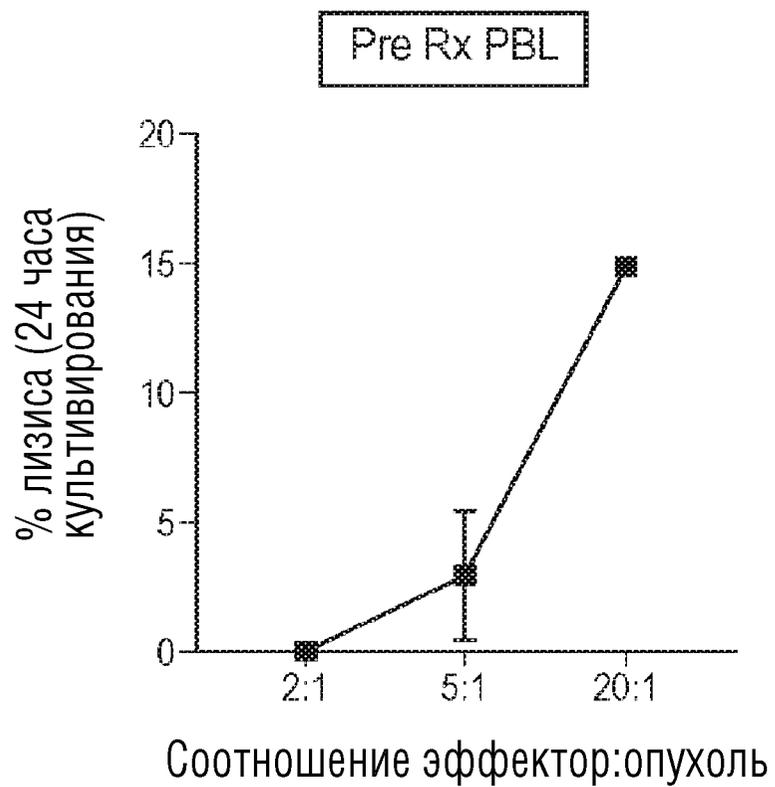
ФИГ.34А



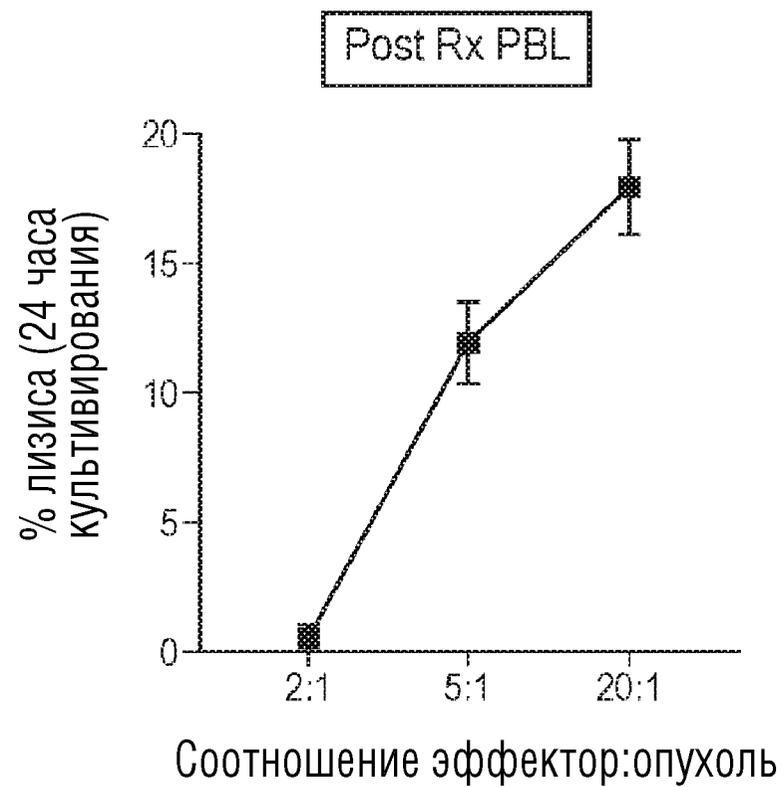
ФИГ.34В



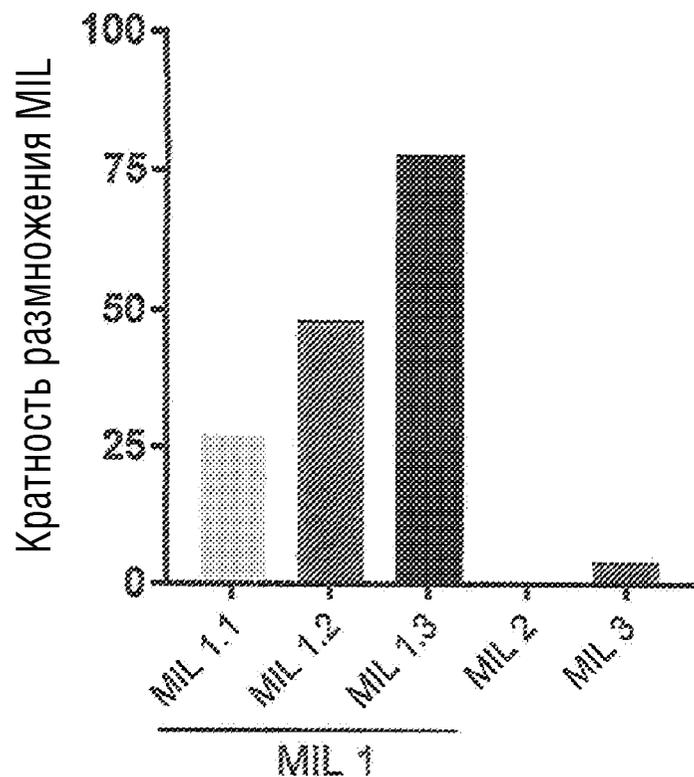
ФИГ.35А



ФИГ.35В

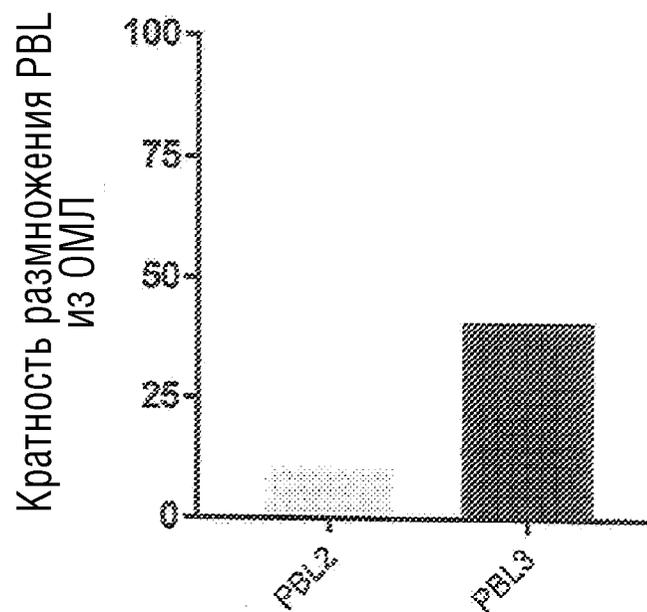


ФИГ.36А



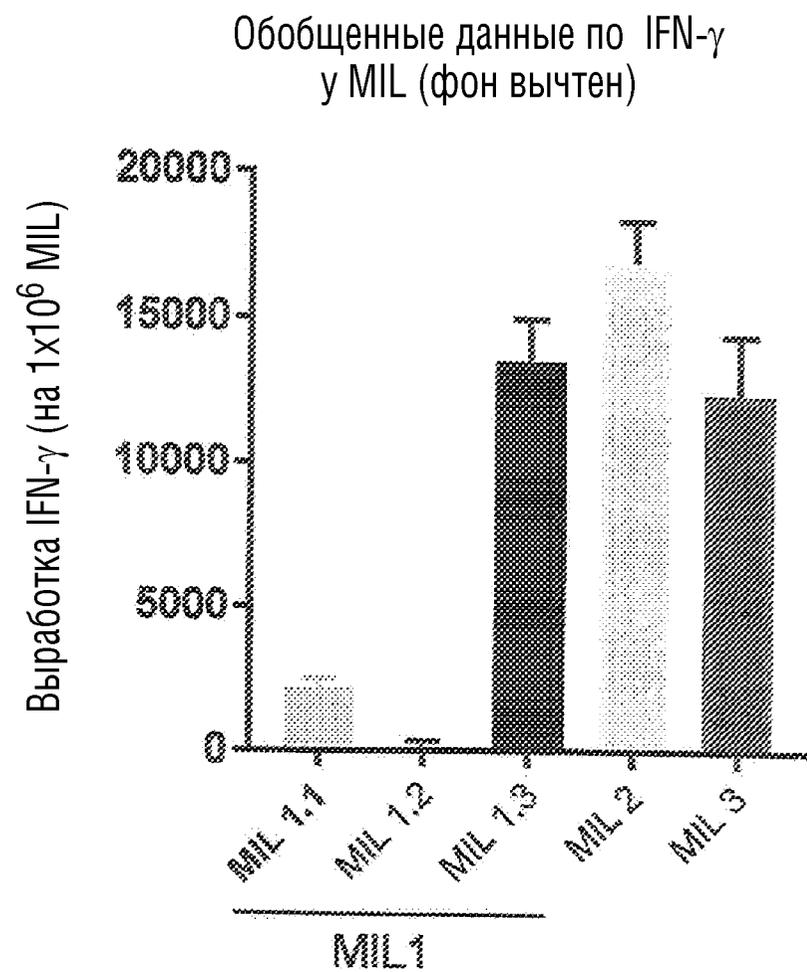
Начальное число клеток
MIL 1.3: 138,000 клеток
MIL2: 62,000 клеток
MIL3: 28,000 клеток

ФИГ.36В

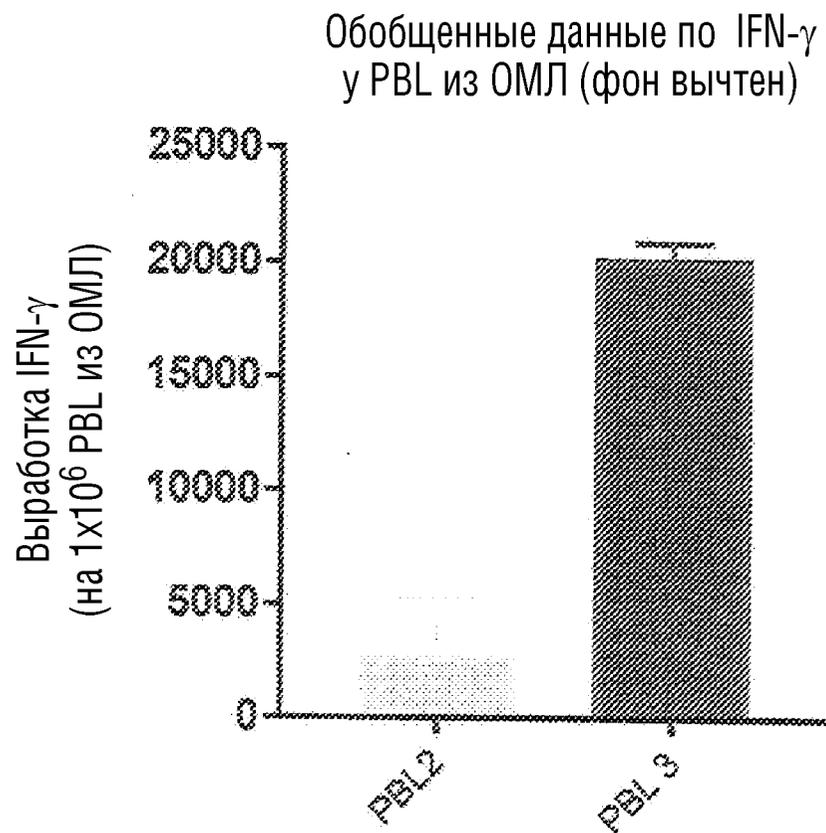


Начальное число клеток
PBL2: 338,000 клеток
PBL3: 336,000 клеток

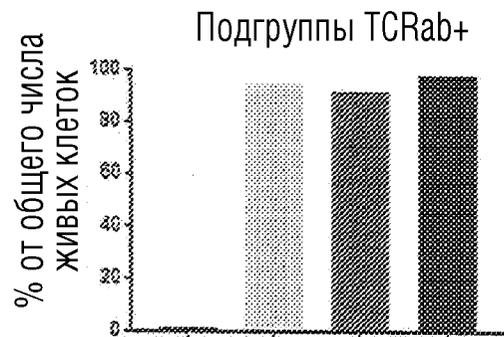
ФИГ.37А



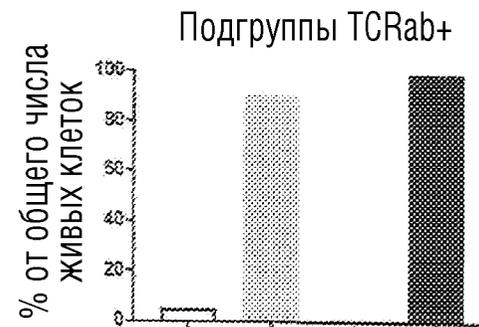
ФИГ.37В



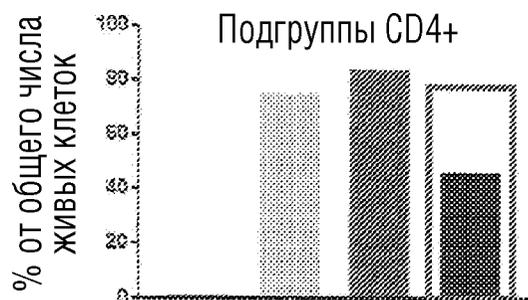
ФИГ.38А



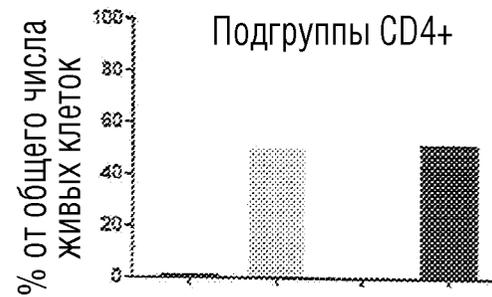
ФИГ.38D



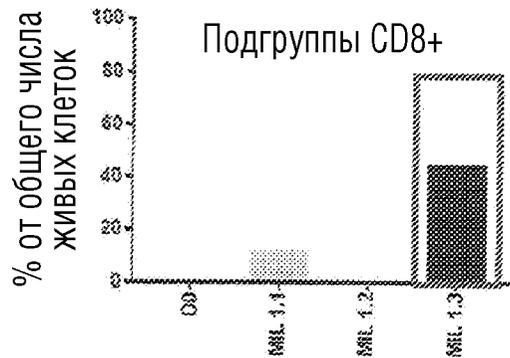
ФИГ.39В



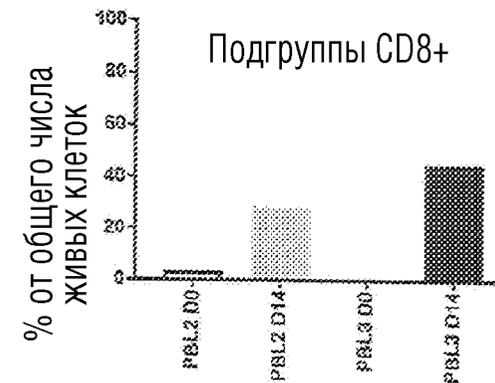
ФИГ.39Е



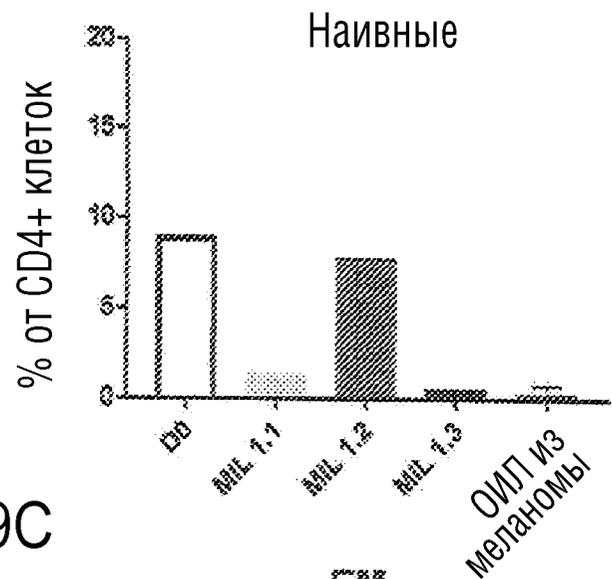
ФИГ.38С



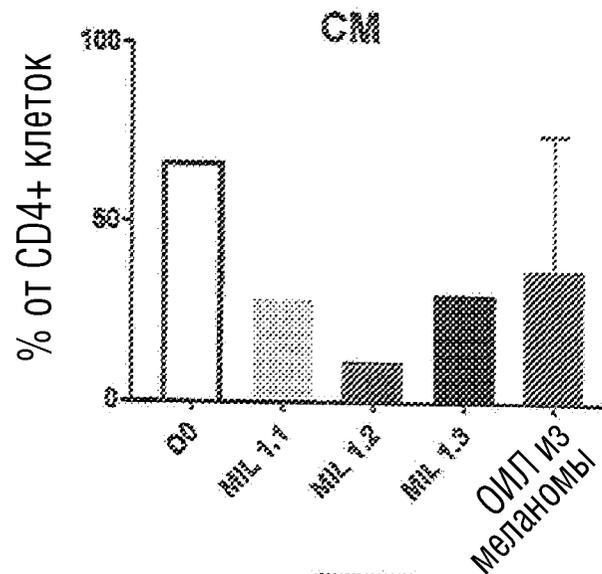
ФИГ.38F



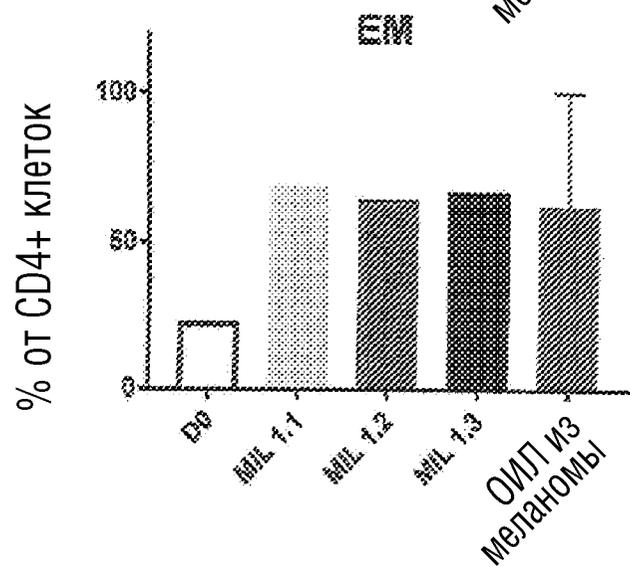
ФИГ.39А



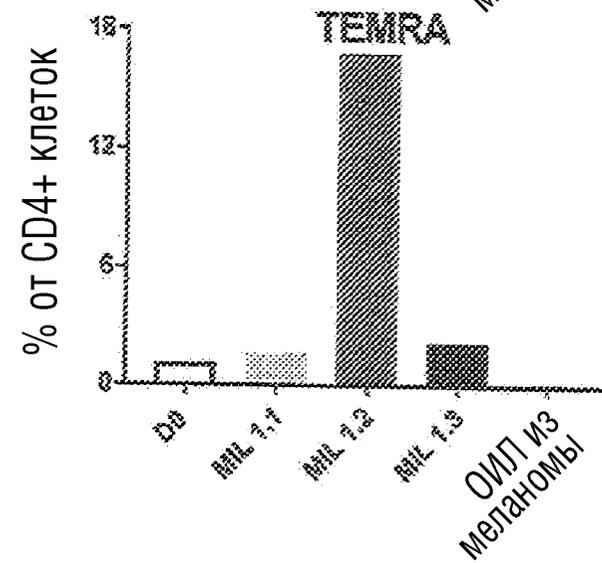
ФИГ.39В



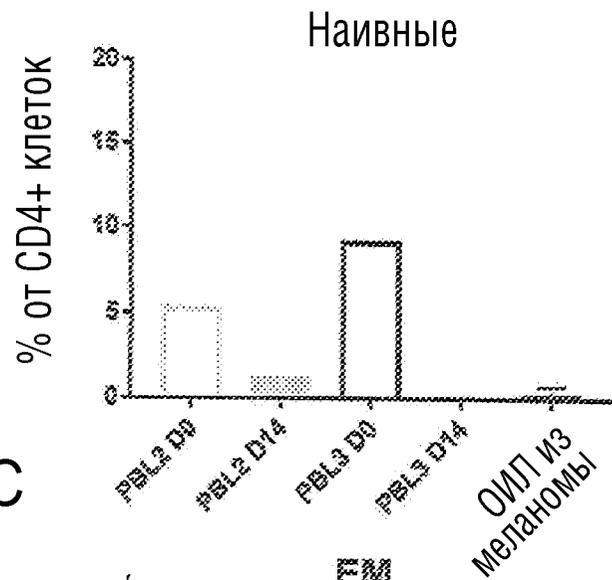
ФИГ.39С



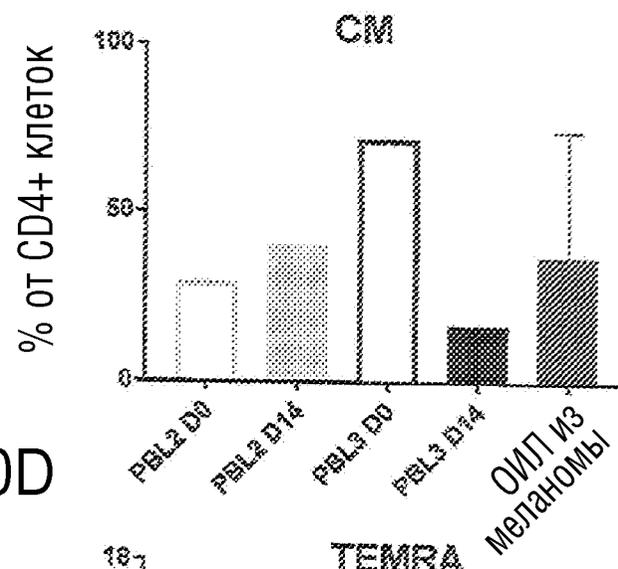
ФИГ.39D



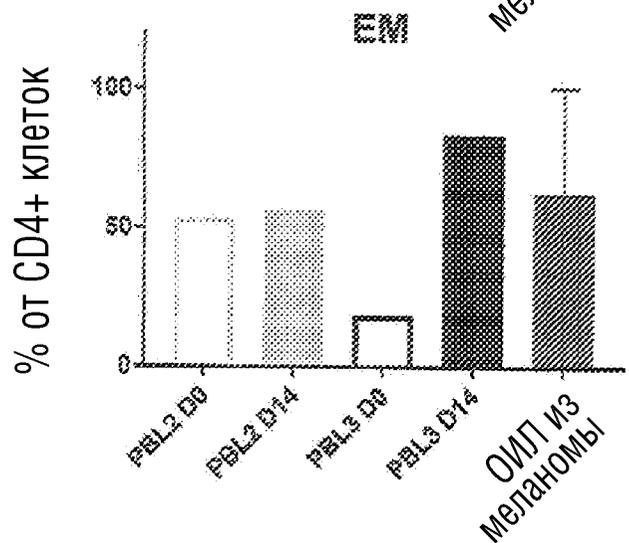
ФИГ.40А



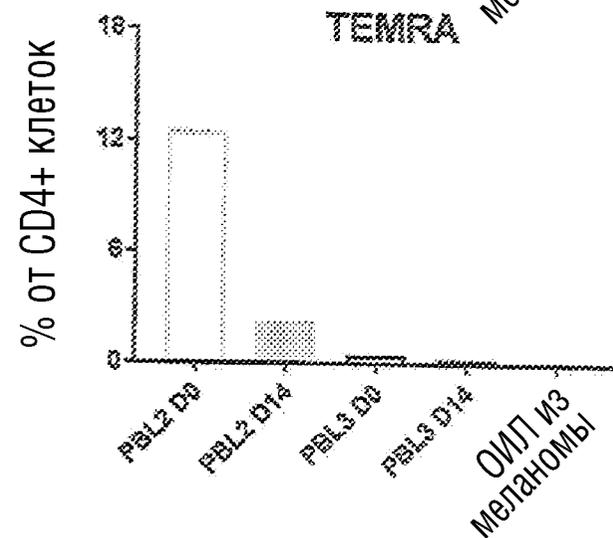
ФИГ.40В



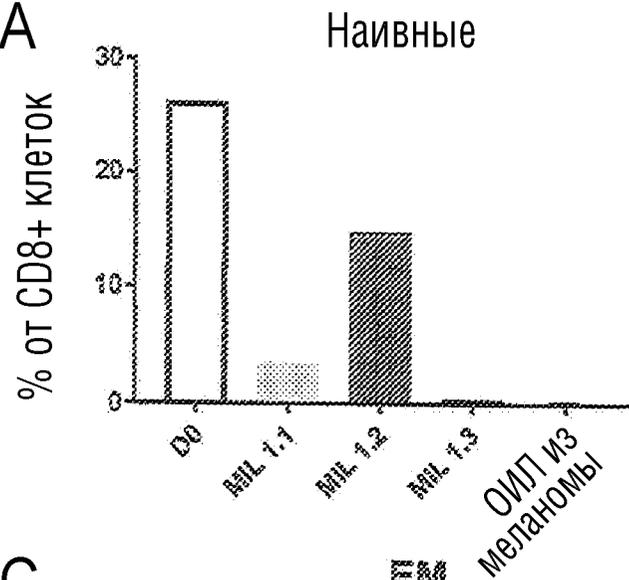
ФИГ.40С



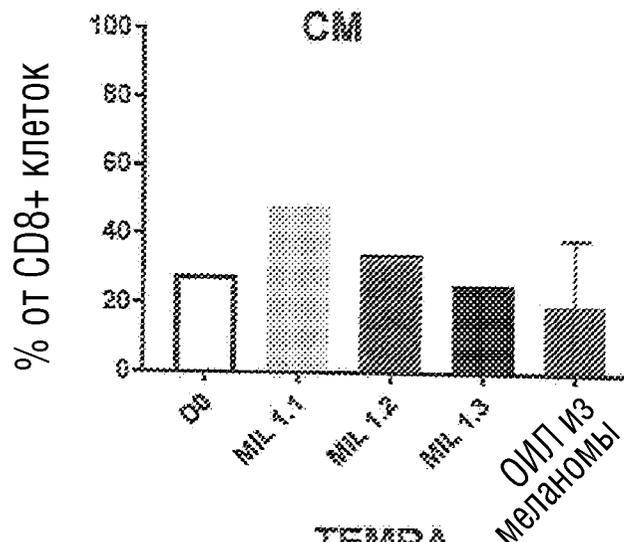
ФИГ.40D



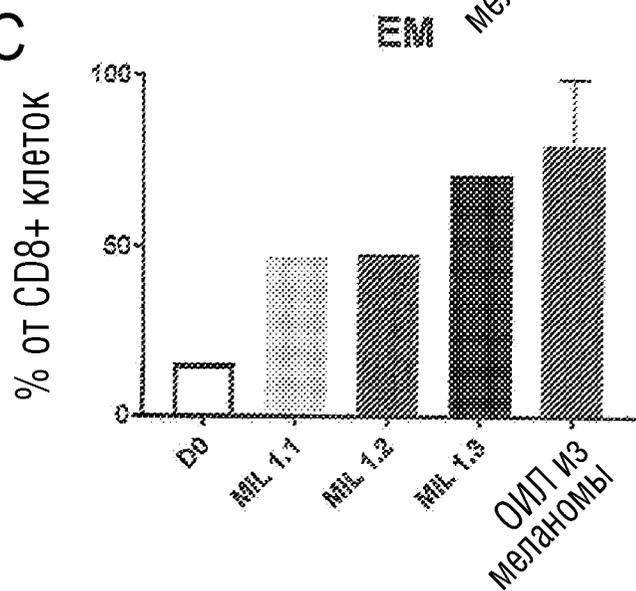
ФИГ.41А



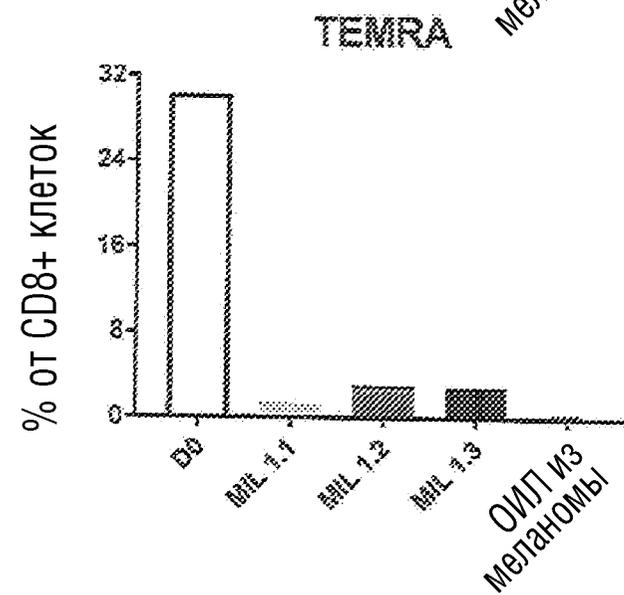
ФИГ.41В



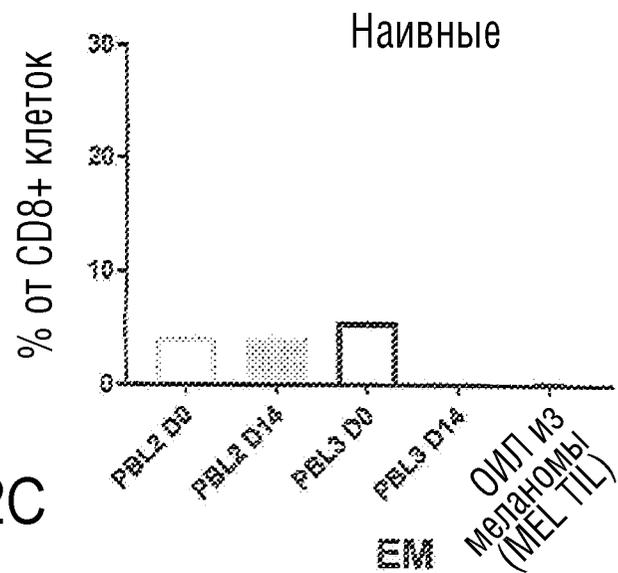
ФИГ.41С



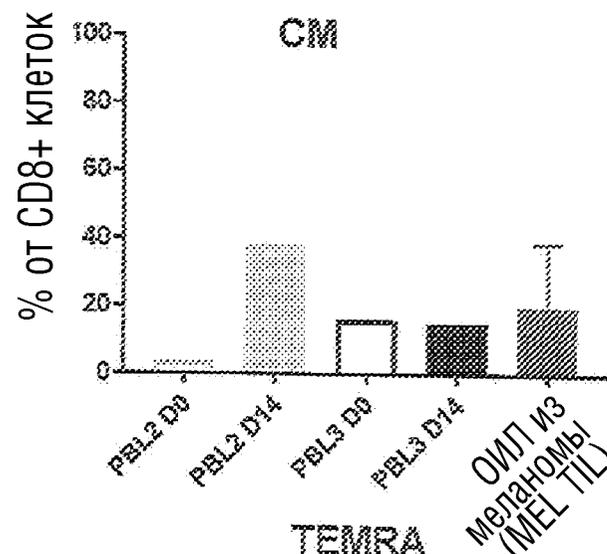
ФИГ.41D



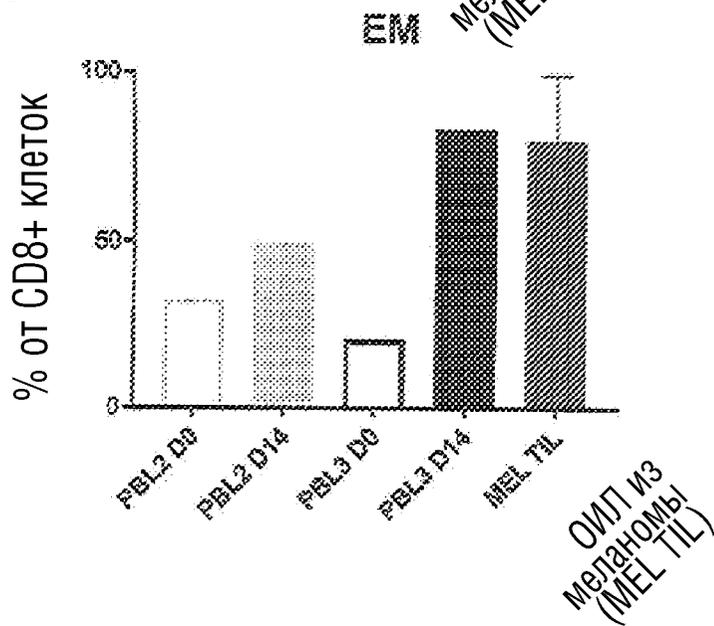
ФИГ.42А



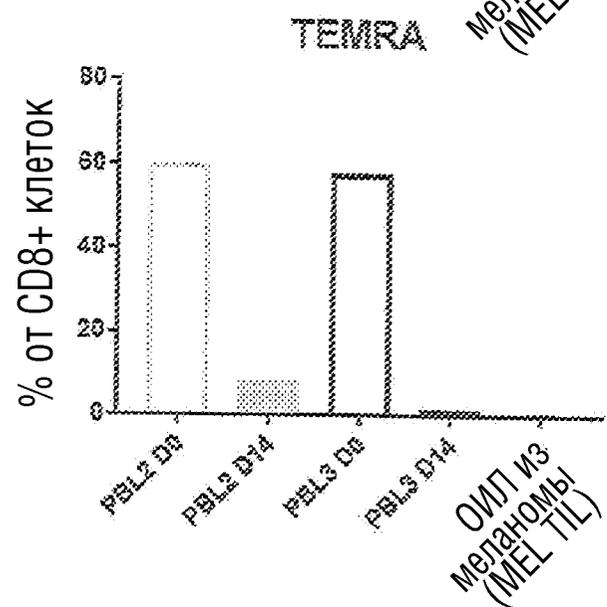
ФИГ.42В



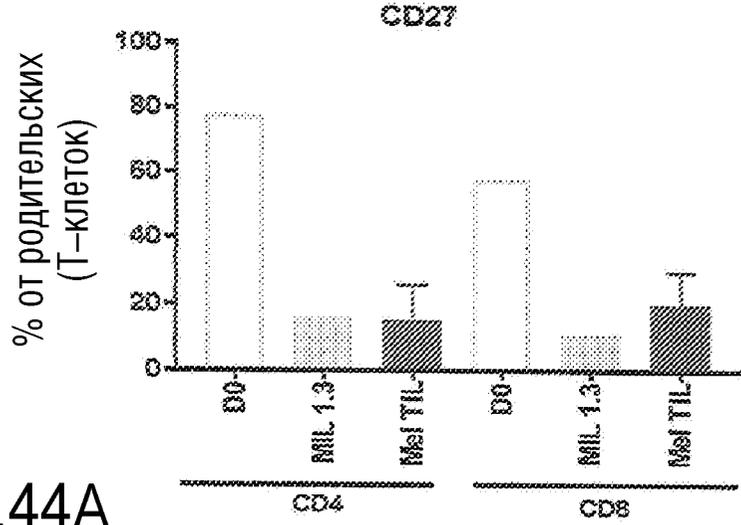
ФИГ.42С



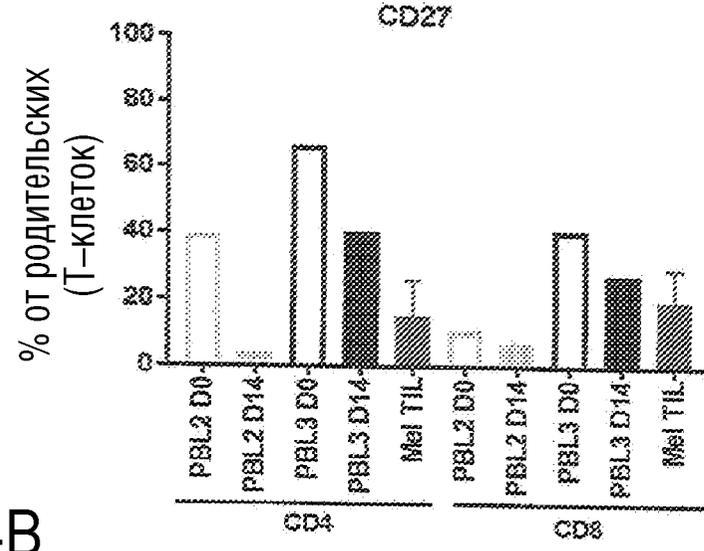
ФИГ.42D



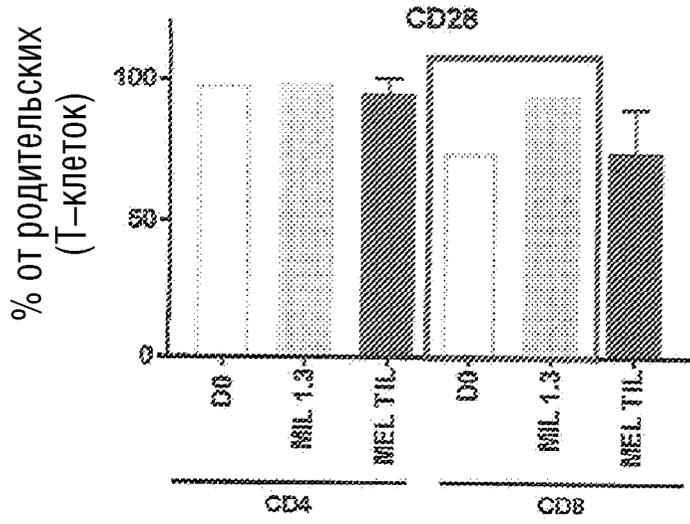
ФИГ.43А



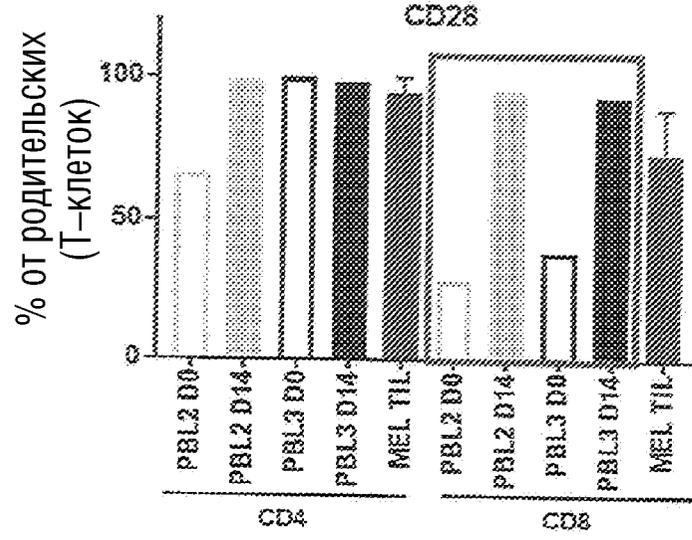
ФИГ.43В



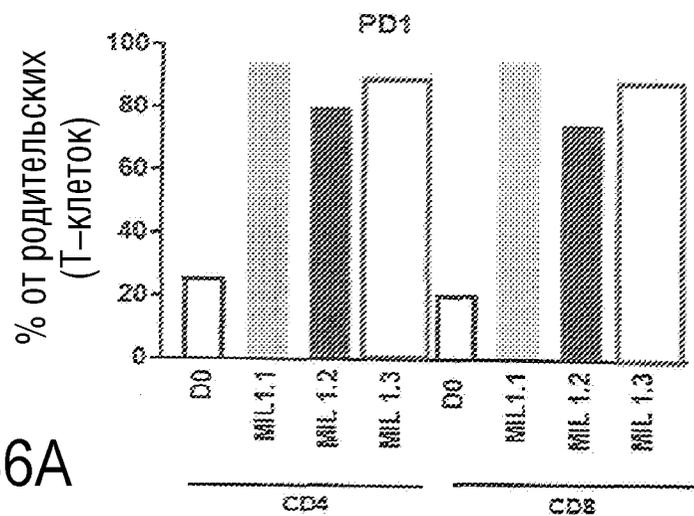
ФИГ.44А



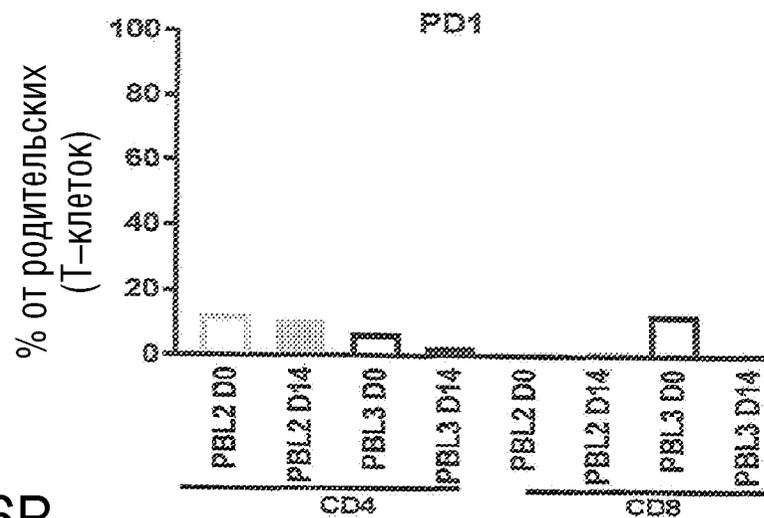
ФИГ.44В



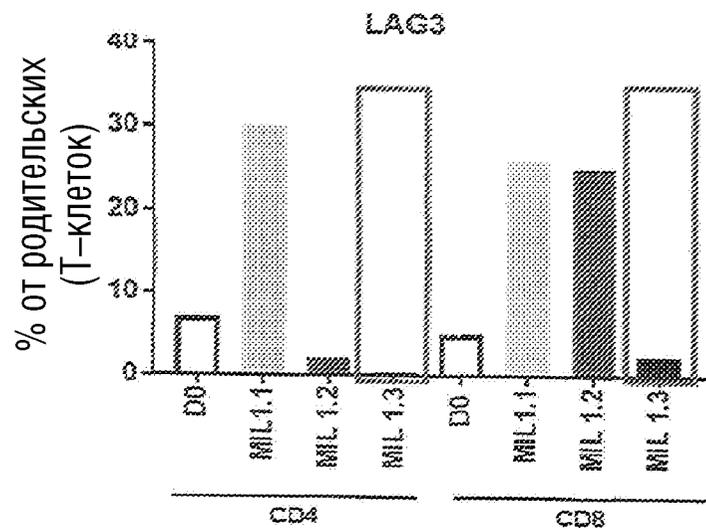
ФИГ.45А



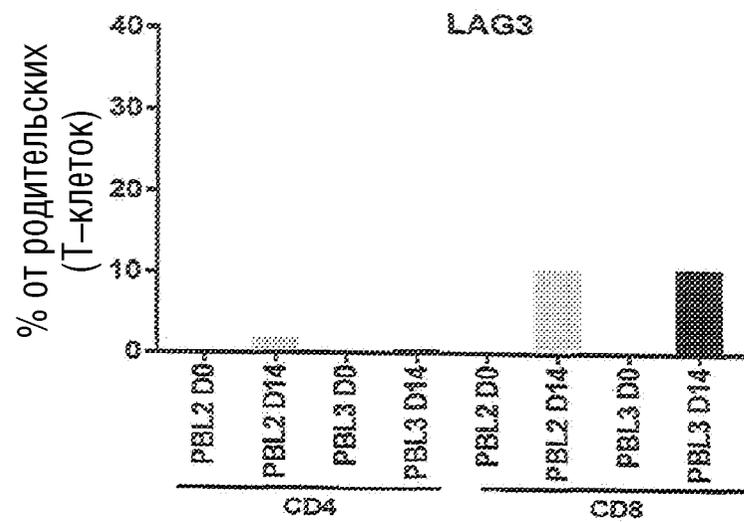
ФИГ.45В



ФИГ.46А

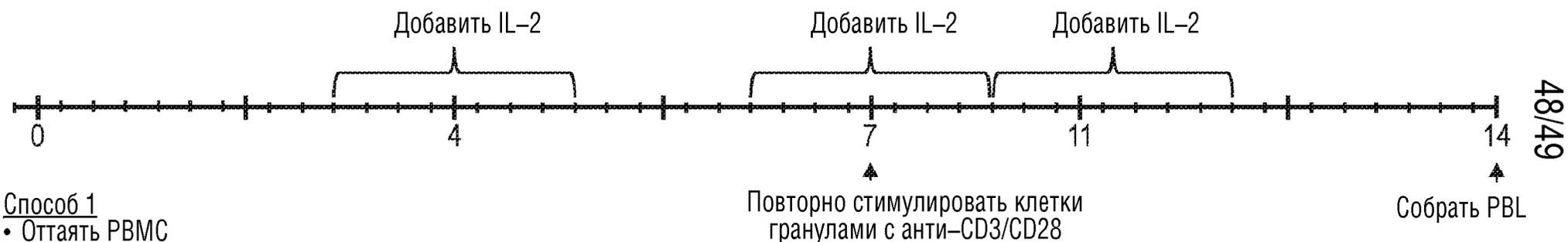


ФИГ.46В



ФИГ.47

Временная шкала – способ размножения PBL из ХЛЛ



Способ 1

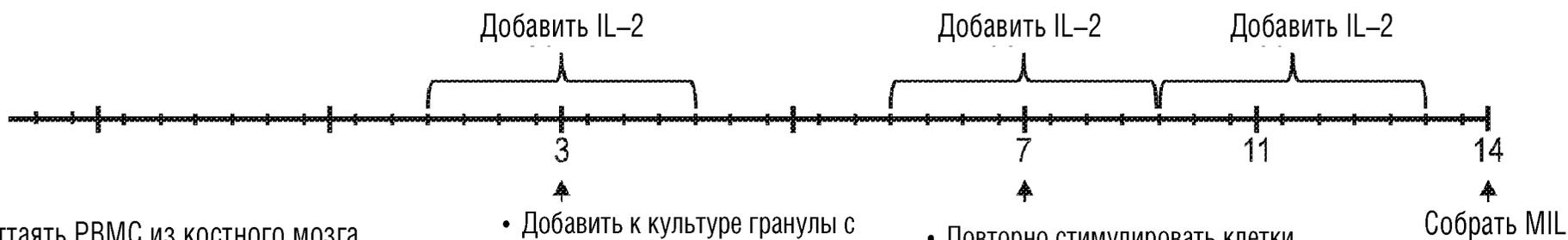
- Оттаять PBMC
- Выделить T-клетки (способ с гранулами - негативная селекция)
- Культивировать T-клетки только в присутствии гранул с анти-CD3/CD28 (соотношение 1:1) и IL-2

Способ 3

- Оттаять PBMC
- Выделить CD19+ B-клетки (способ с гранулами – положительная селекция)
- Выделить T-клетки (способ с гранулами – негативная селекция)
- Совместно культивировать T-клетки и B-клетки в присутствии гранул с анти-CD3/CD28 (соотношение 1:1) и IL-2

ФИГ.48

Временная шкала – способ размножения MIL из ОМЛ



- Оттаять РВМС из костного мозга
- Отсортировать фракцию иммунных клеток (CD3+ CD33+ CD20+CD14+)
- Отсортировать ОМЛ-бластную фракцию (не-CD3+CD33+CD20+CD14+)
- Разрушить ОМЛ-бластную фракцию и добавить к фракции иммунных клеток
- Культивировать клетки в присутствии IL-2

- Добавить к культуре гранулы с анти-CD3/CD28 в соотношении 1:1

- Повторно стимулировать клетки гранулами с анти-CD3/CD28

Собрать MIL

ФИГ.1

NHL	Название поставщика	Пол	Возраст	Гистологический подтип	Степень	Положительные маркеры	Место
NHL17001	530-A992	М	75	Лимфома мантийных клеток (ЛМК)	обычная, не агрессивная	CD19, CD20, CD5, CYCLIN-D+	Левый паховый
NHL17001	530-A993	Ж	55	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	1	CD20, CD10, BCL2	Левый, уровень III
NHL17001	850-B104	М	63	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	1–2 из 3	BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD3, CD5, CD10, CD20, CD43, PAX5	Правая рука (опухоль мягких тканей)
NHL17001	310-E799	М	62	Фолликулярная лимфома (ФЛ)	не описана	CD3, CD5, CD10, CD15, CD20, CD30, CD45, Pax-5, Ki-67	Правая опухоль, уровень II, правая задняя опухоль (резекция)
NHL17001	850-B327	Ж	33	Диффузная крупноклеточная В-клеточная лимфома (ДКВКЛ)	Крупноклеточная В-клеточная лимфома высокой степени	BCL1, BCL2, BCL6, CD3, CD20, C-MYC, CD30, MUM-1	Опухоль средостения

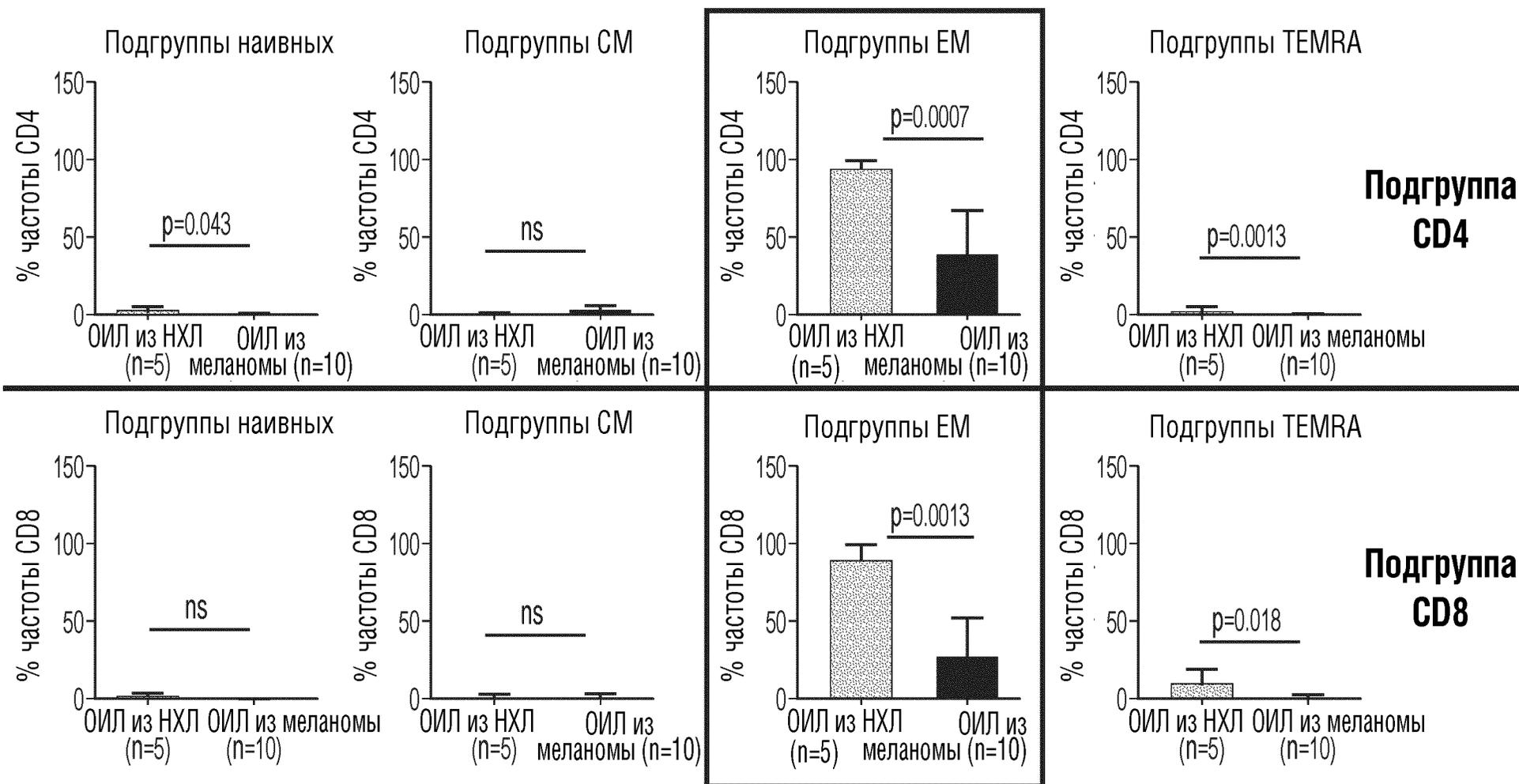
ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА

1/49

559734

ФИГ.2

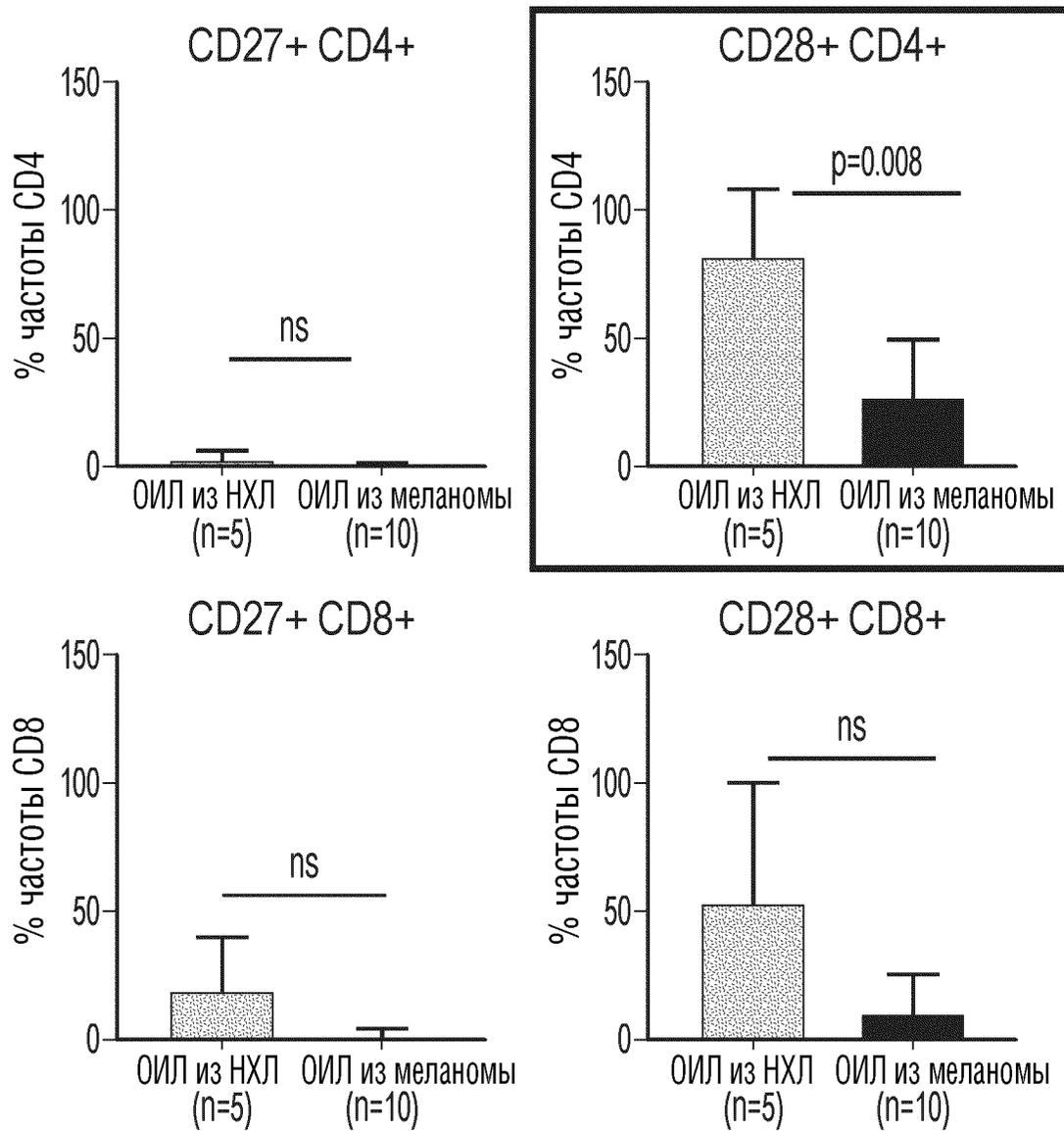
УПОНЕНАЯ СТРАНИЦА



Подгруппа CD4

Подгруппа CD8

ФИГ.3

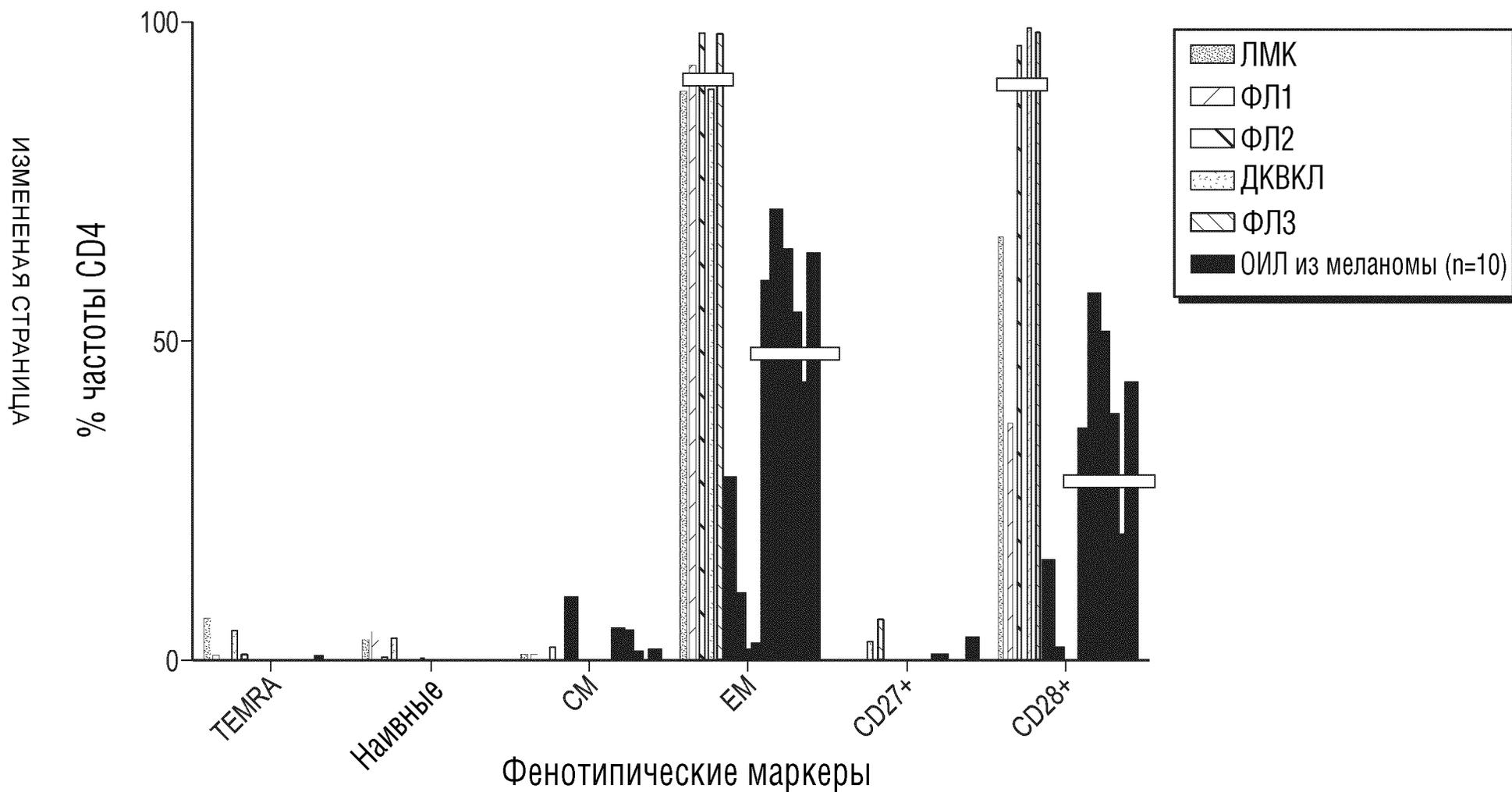


Подгруппа
CD4

Подгруппа
CD8

ФИГ.4

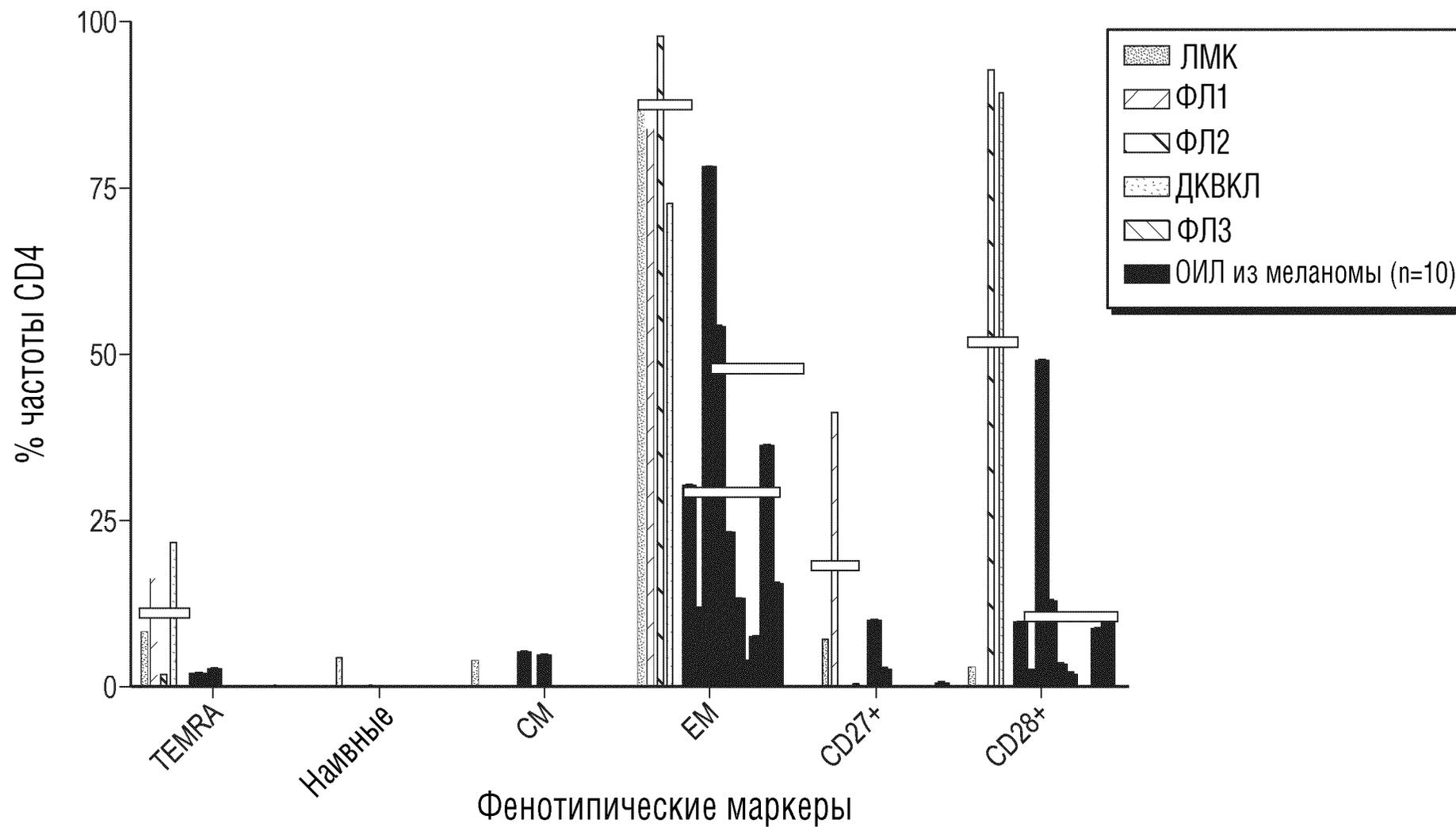
Подгруппа CD4



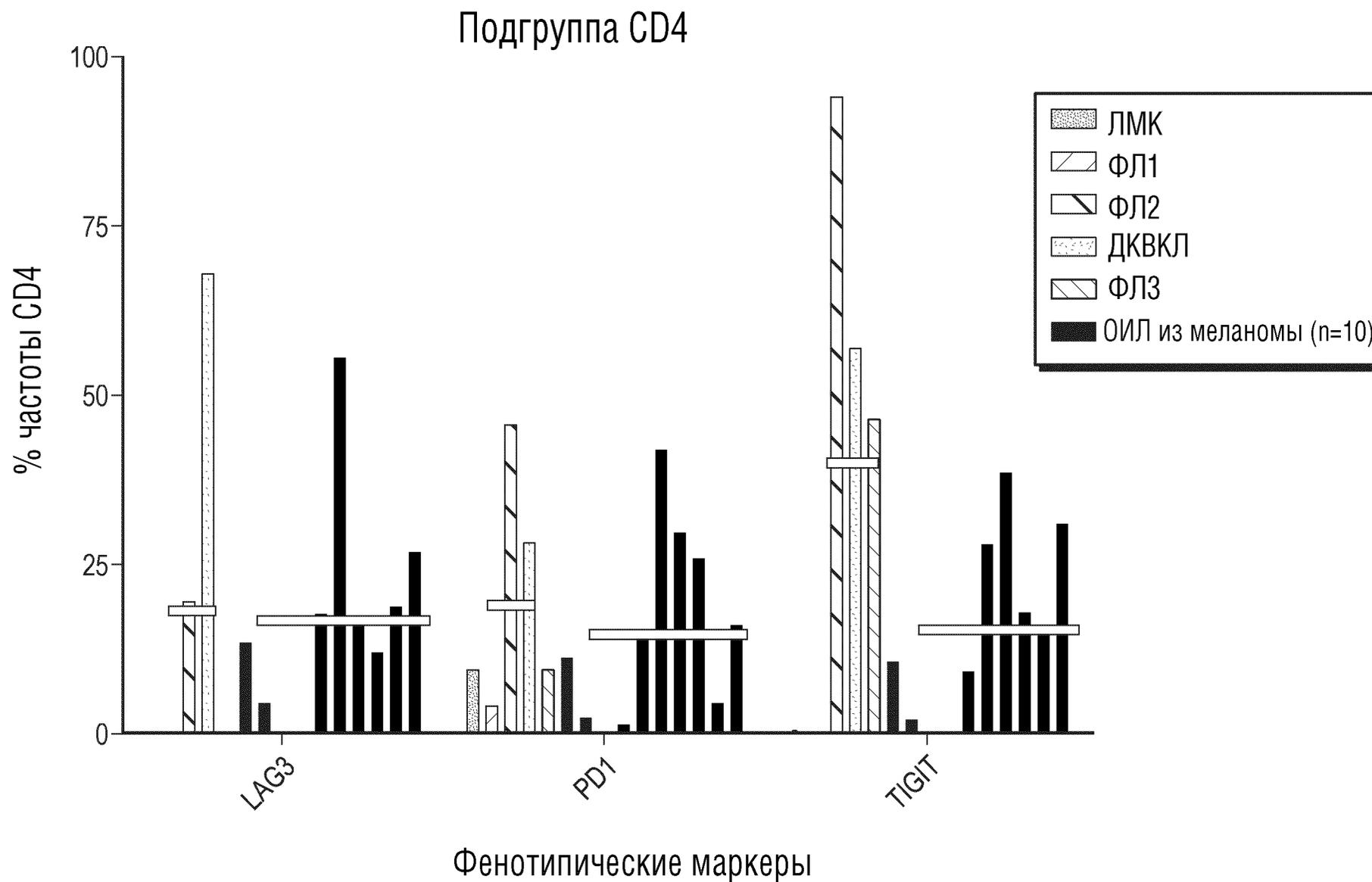
ФИГ.5

Подгруппа CD8

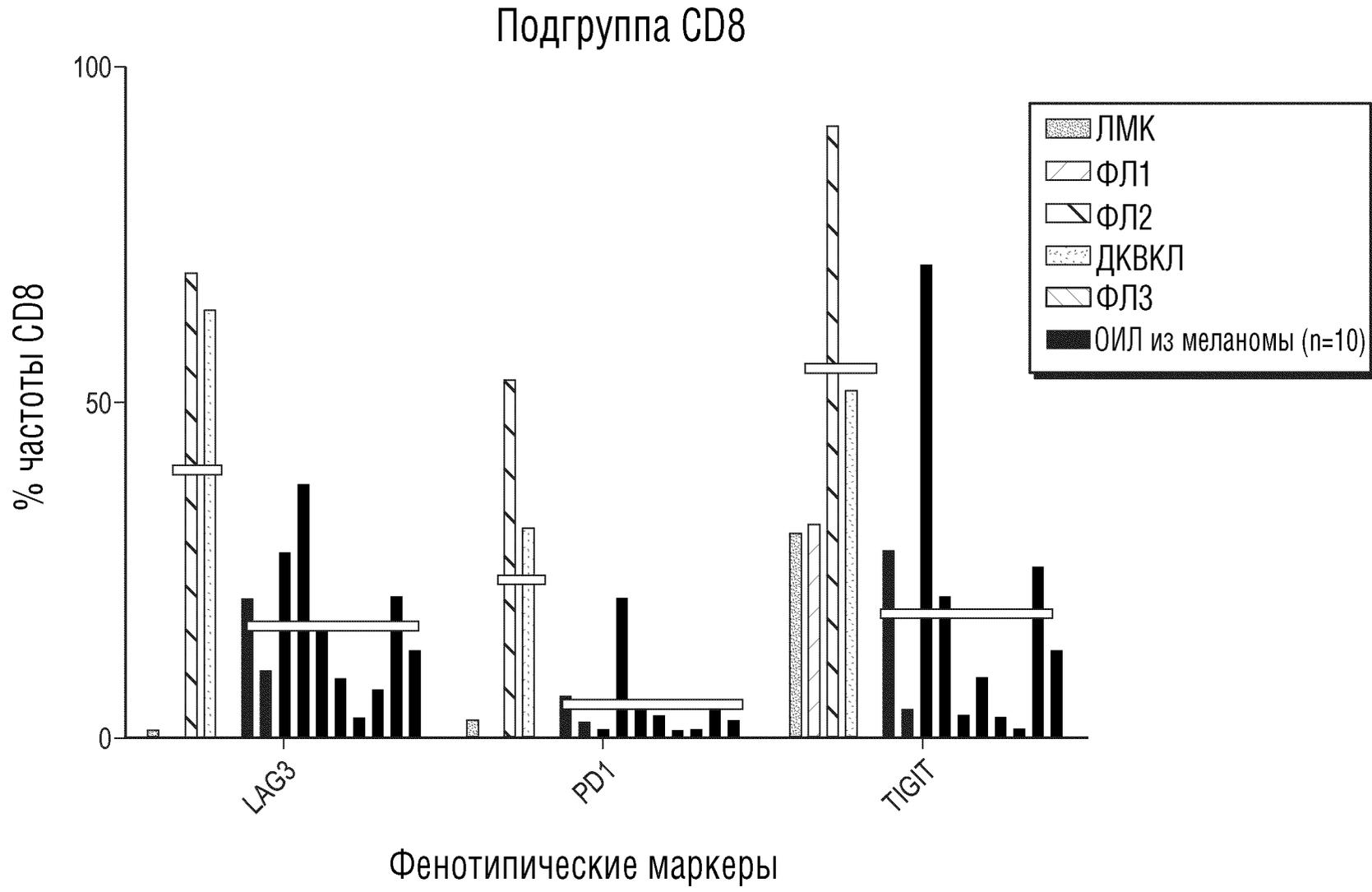
ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА



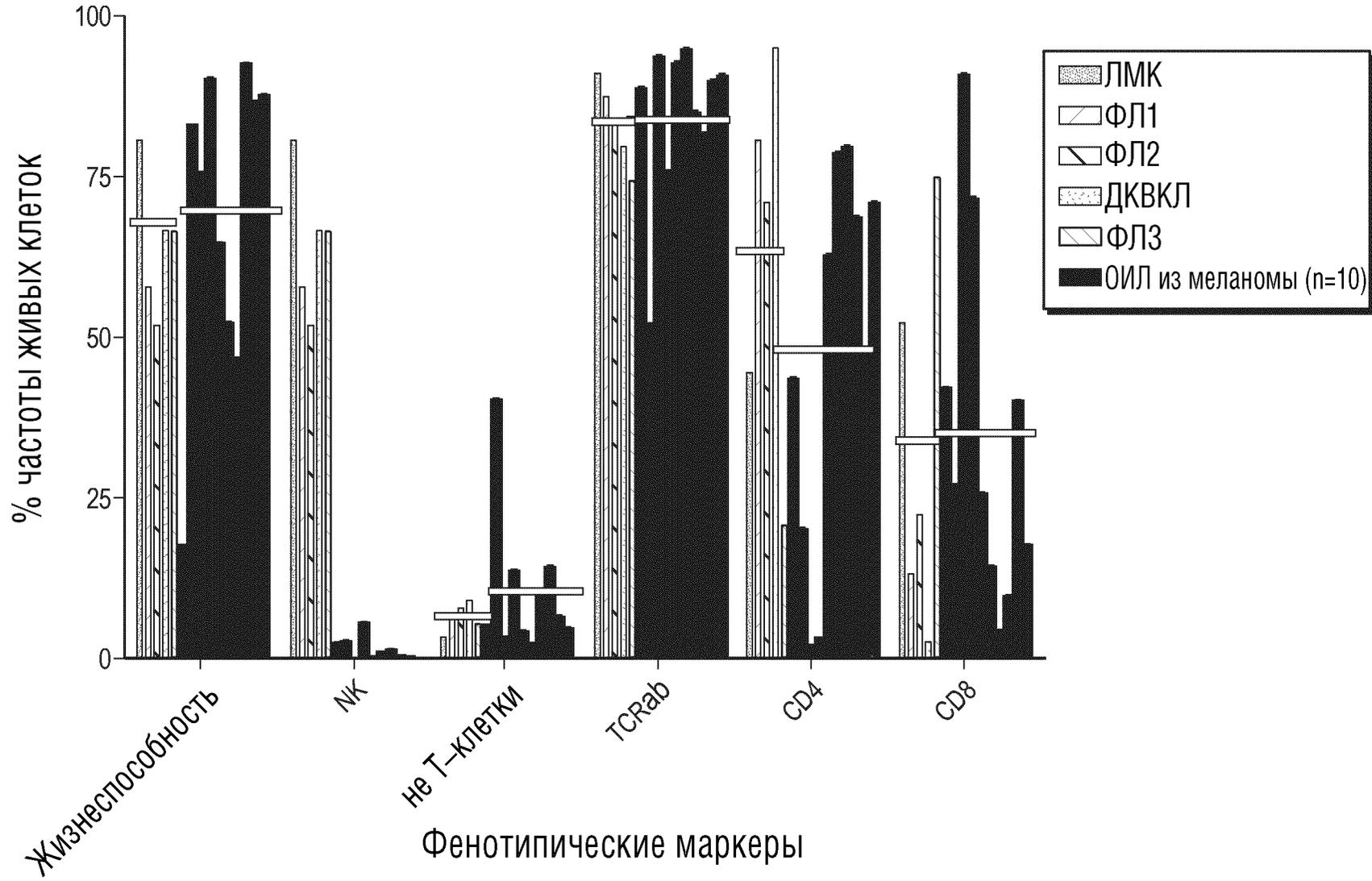
ФИГ.6



ФИГ.7



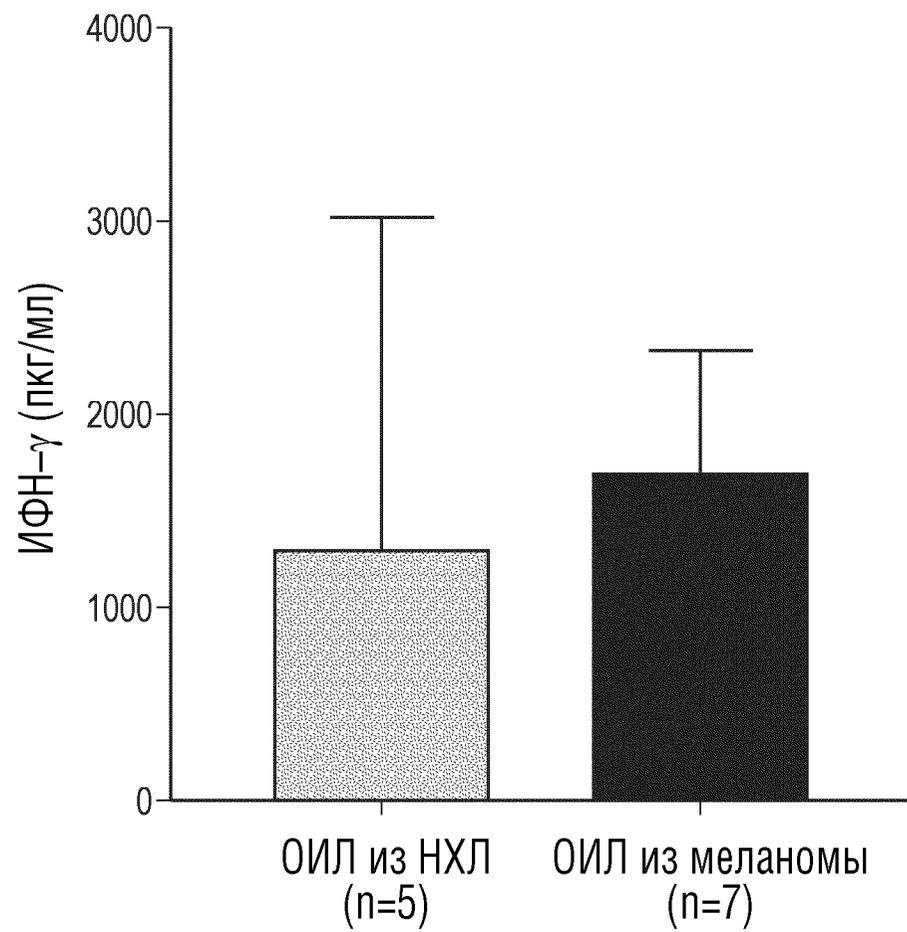
ФИГ.8



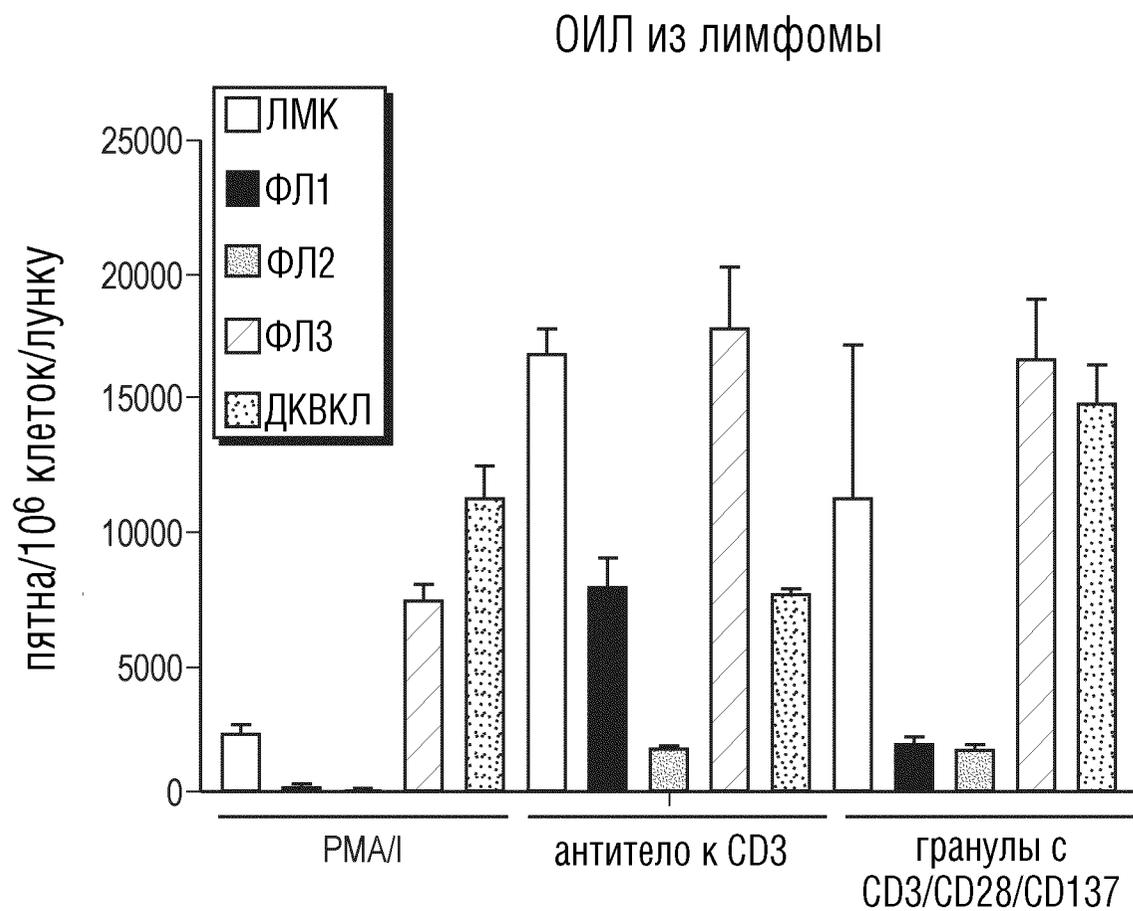
ФИГ.9

Тип ОИЛ		LU50	
		4 ч	24 ч
ОИЛ из меланомы	ОИЛ 1	15	ND
	ОИЛ 2	40.4	ND
	ОИЛ 3	46	ND
	ОИЛ 4	75.2	ND
	ОИЛ 5	10.6	ND
	ОИЛ 6	13.5	ND
	ОИЛ 7	17.9	ND
ОИЛ из лимфомы	ОИЛ 1 (ЛМК)	6	24
	ОИЛ 2 (ФЛ)	<1	2
	ОИЛ 3 (ФЛ)	ND	ND
	ОИЛ 4 (ФЛ)	8	39
	ОИЛ 5 (ДКВКЛ)	<1	1.4

ФИГ.10

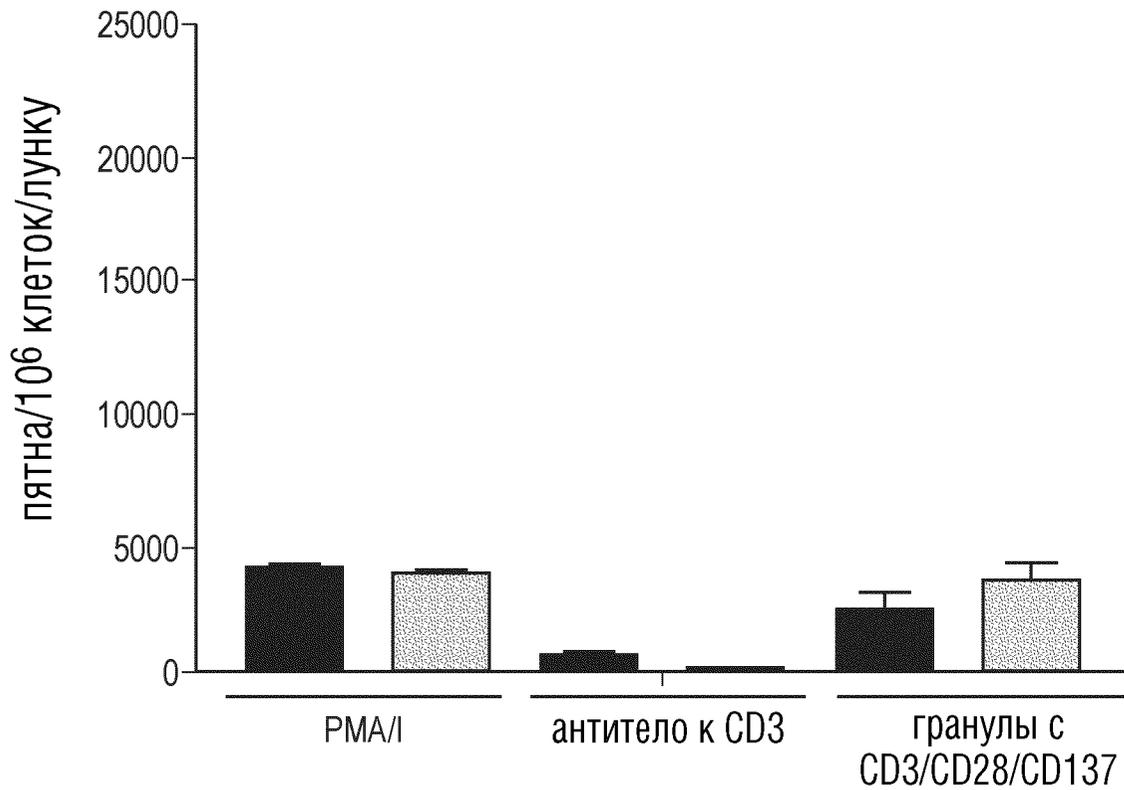


ФИГ.11

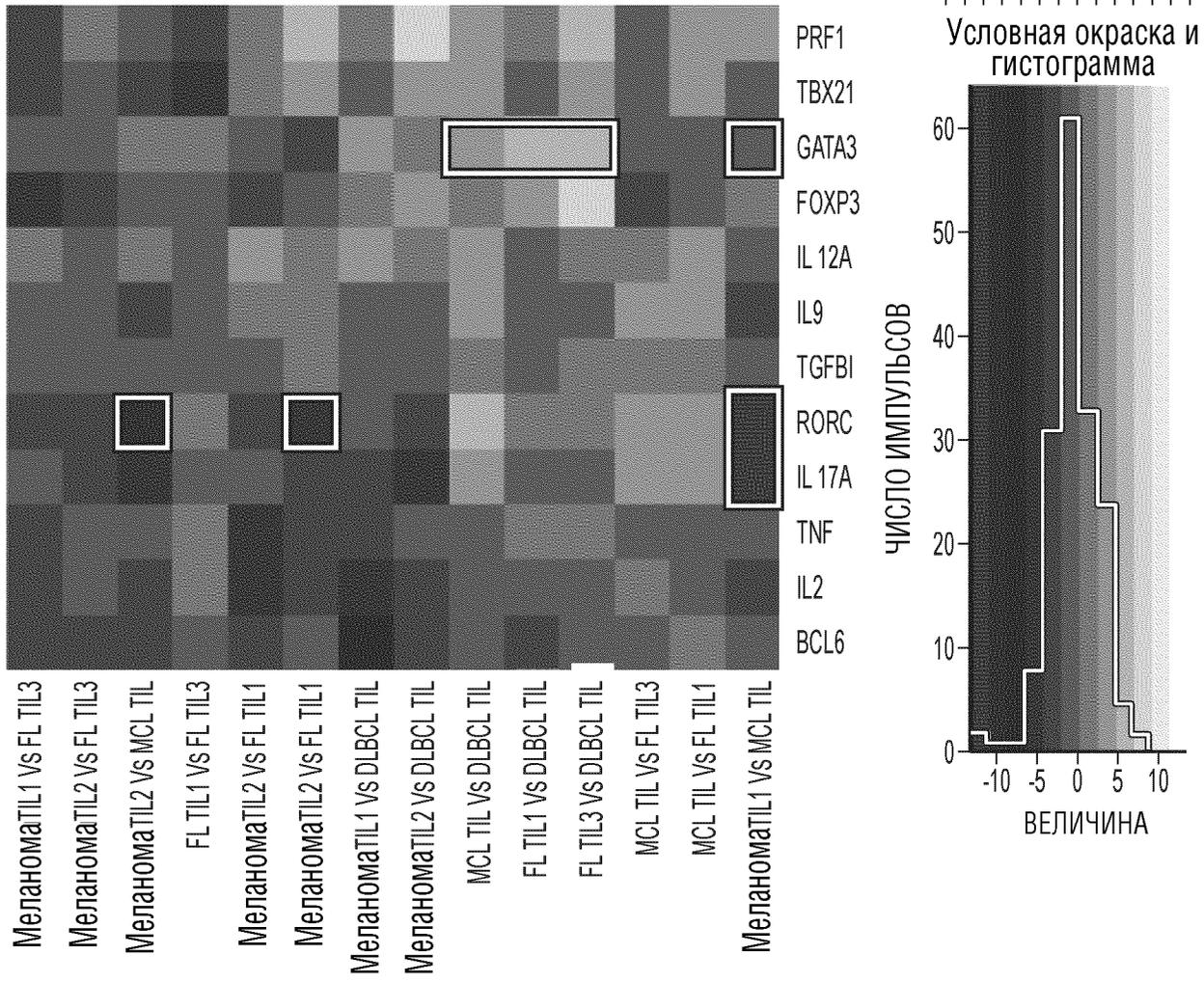


ФИГ.12

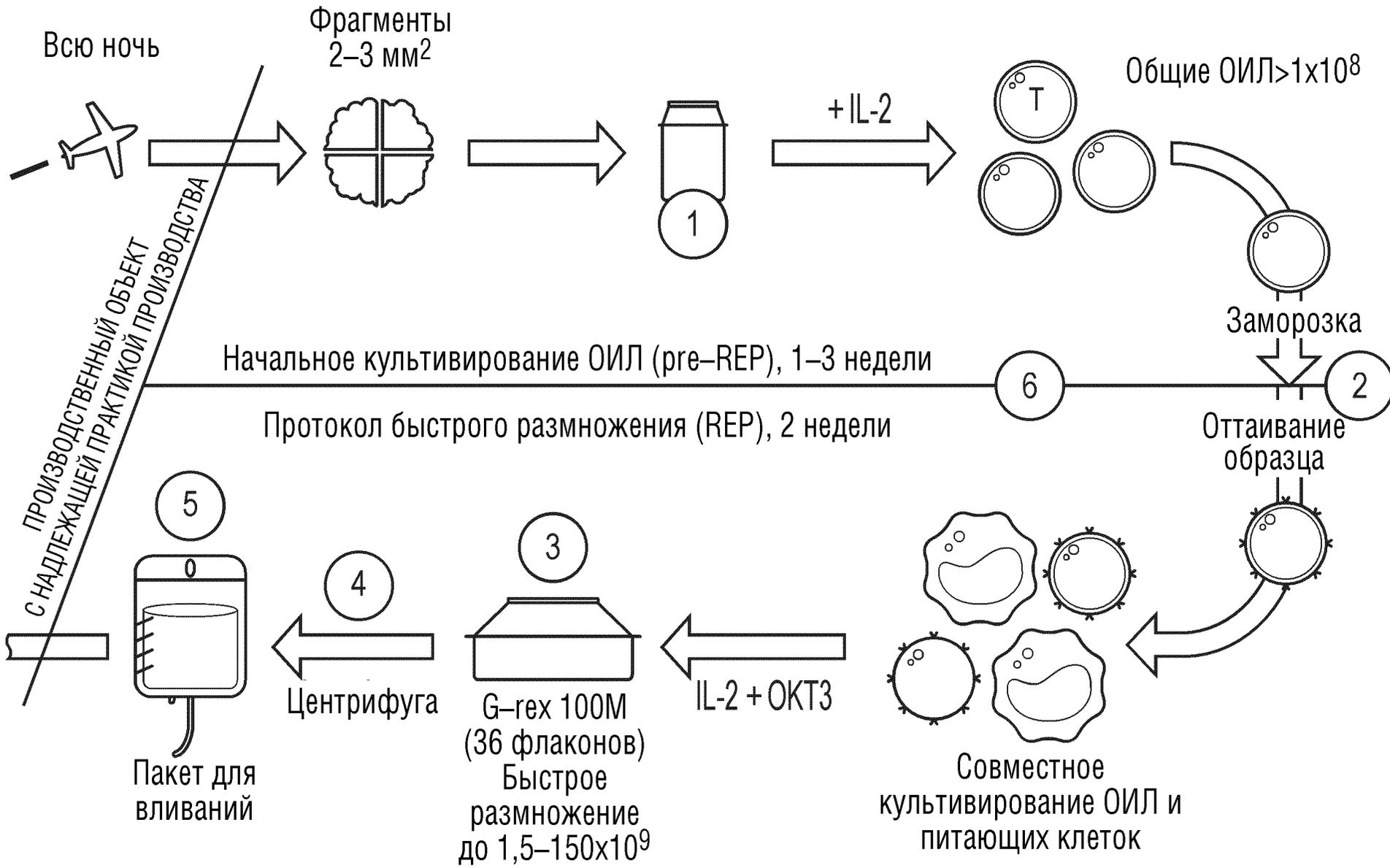
ОИЛ из меланомы



ФИГ.13



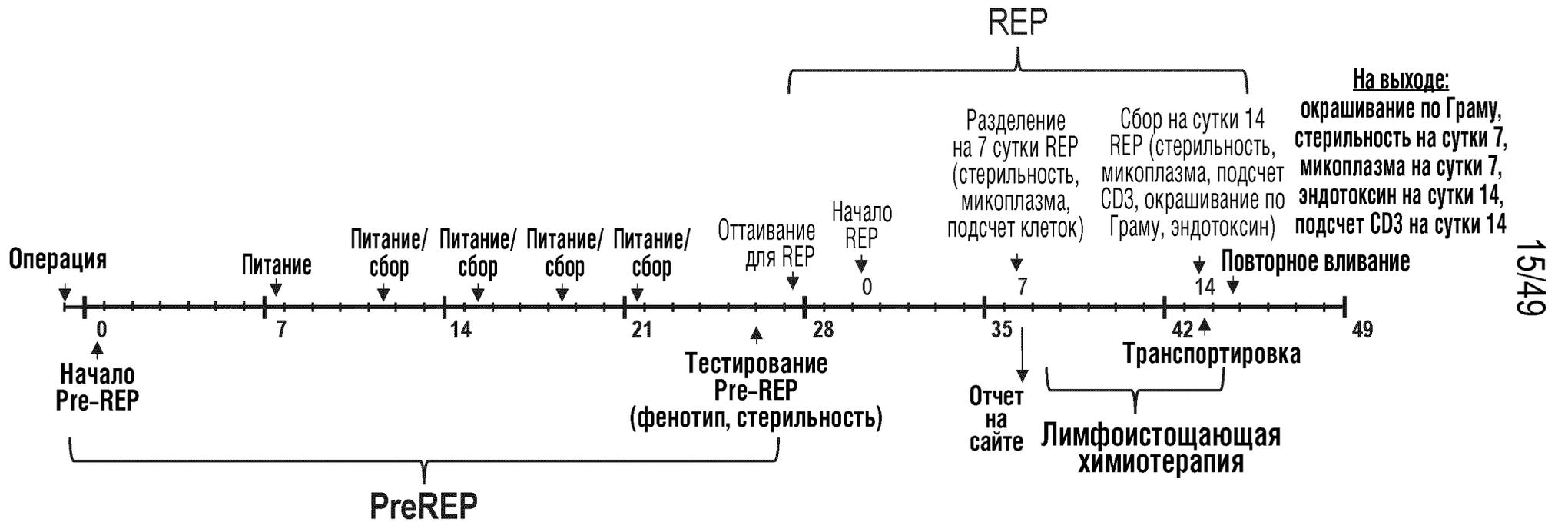
ФИГ.14



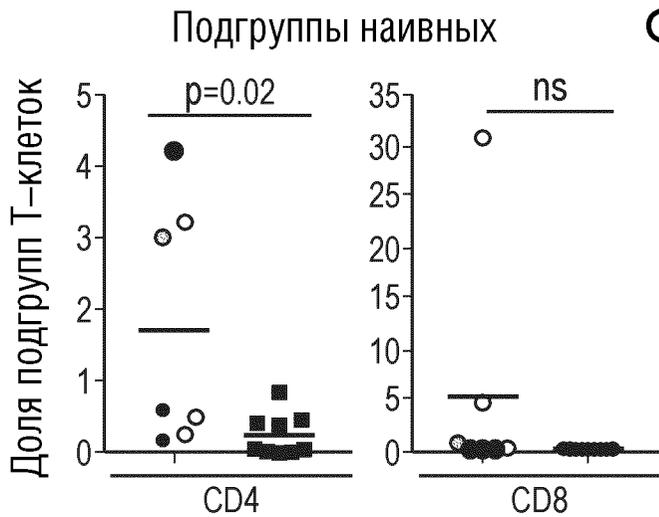
ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА

14/49

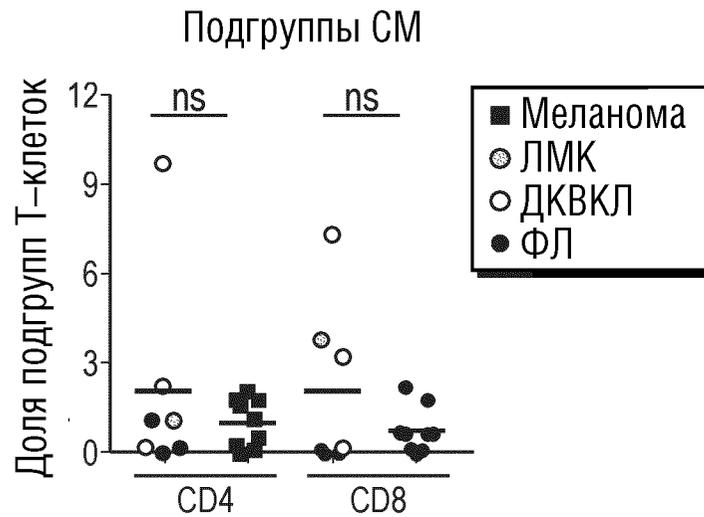
ФИГ.15



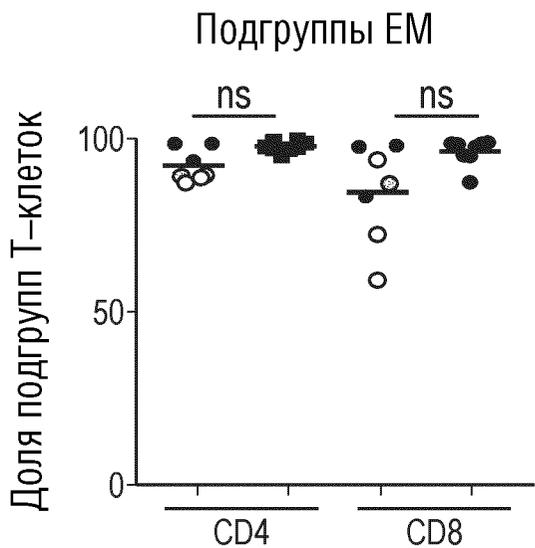
ФИГ.16А



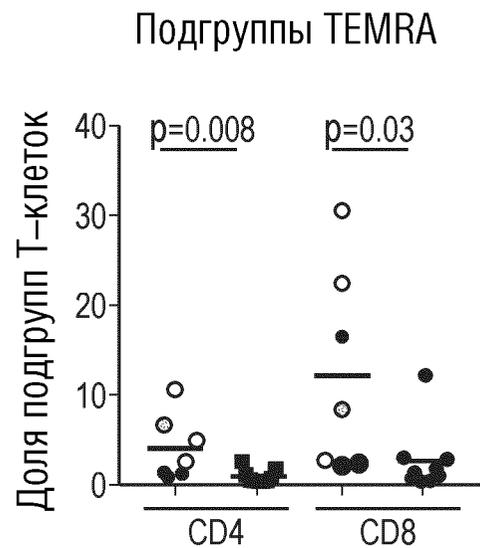
ФИГ.16В



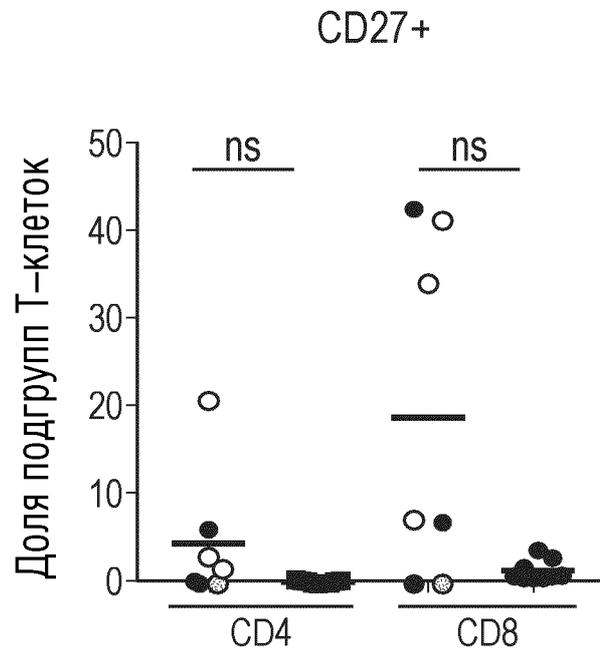
ФИГ.16С



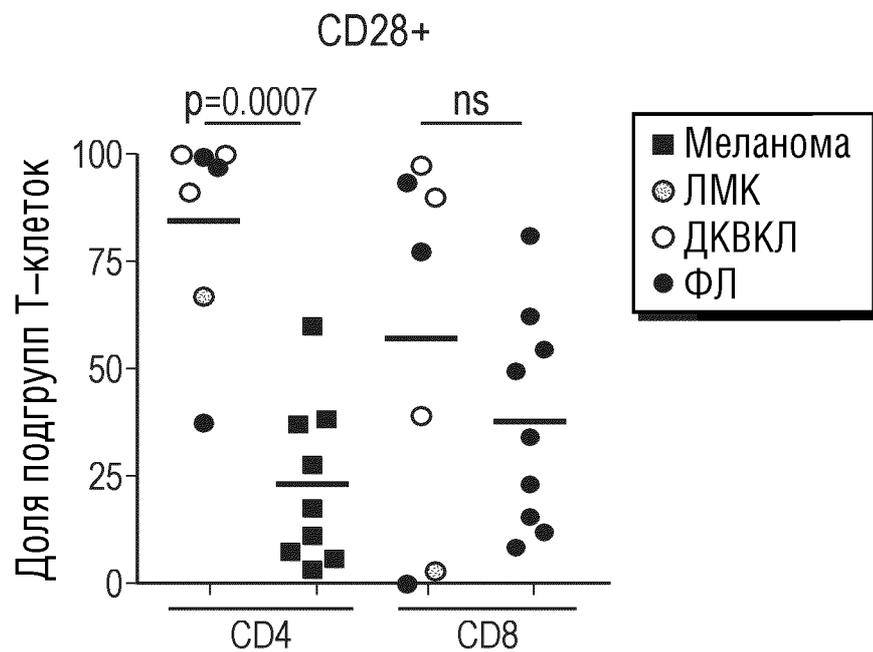
ФИГ.16D



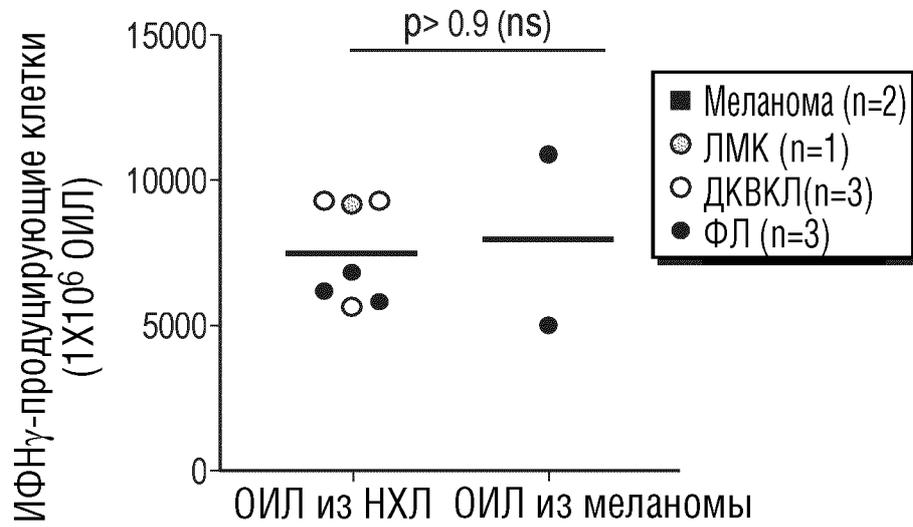
ФИГ.17А



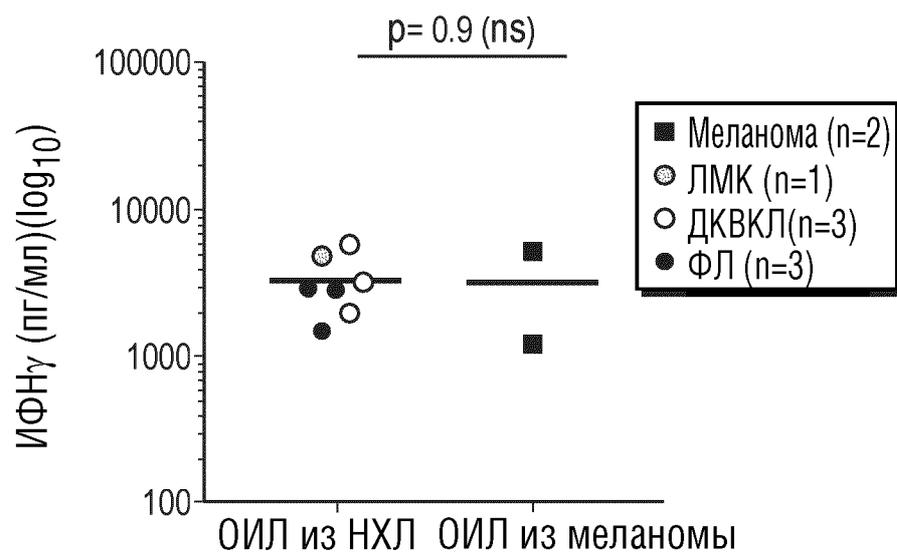
ФИГ.17В



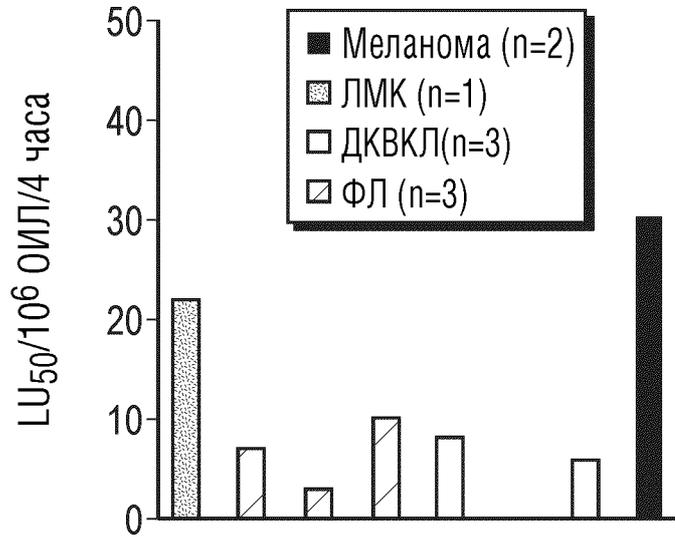
ФИГ.18А



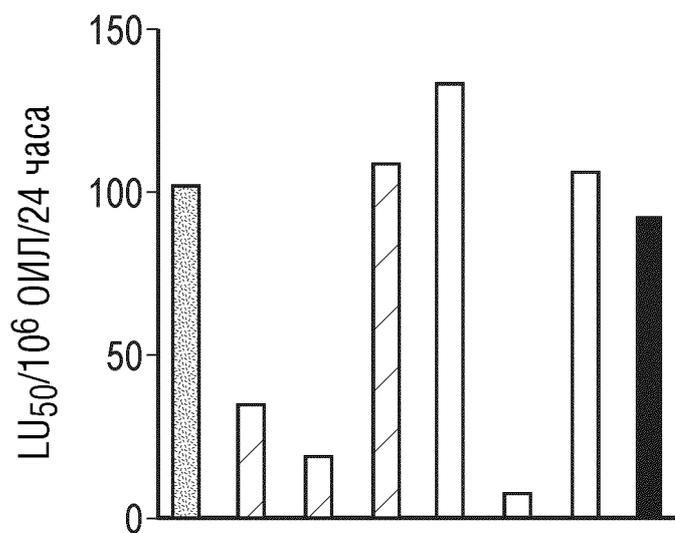
ФИГ.18В



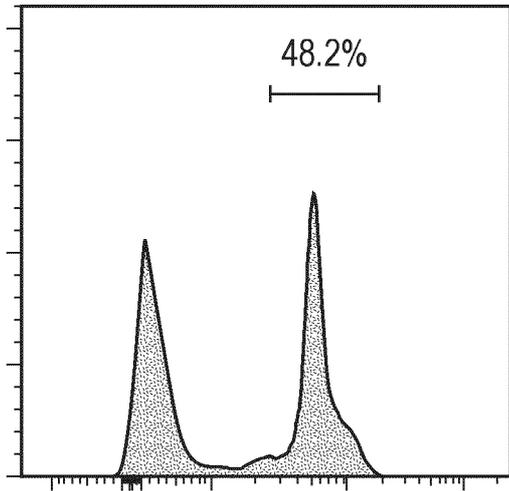
ФИГ.19А



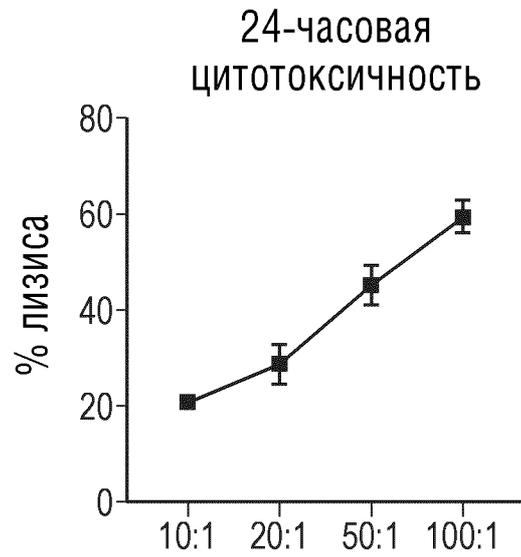
ФИГ.19В



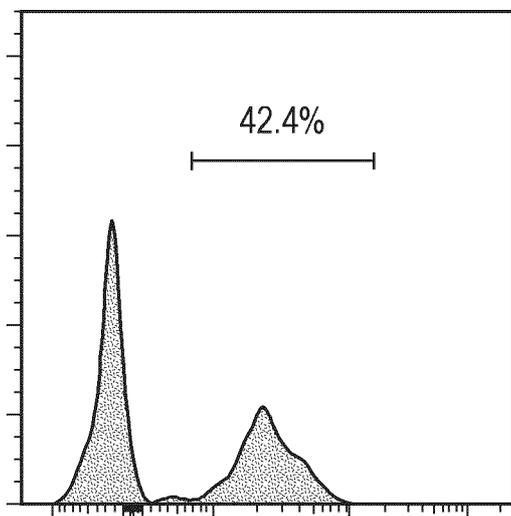
ФИГ.20А



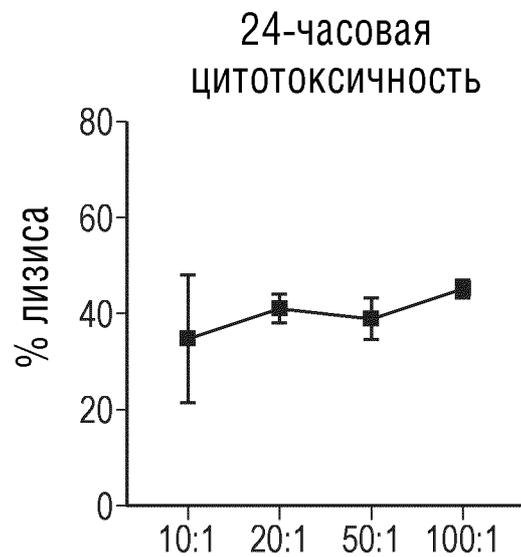
ФИГ.20В



ФИГ.20С

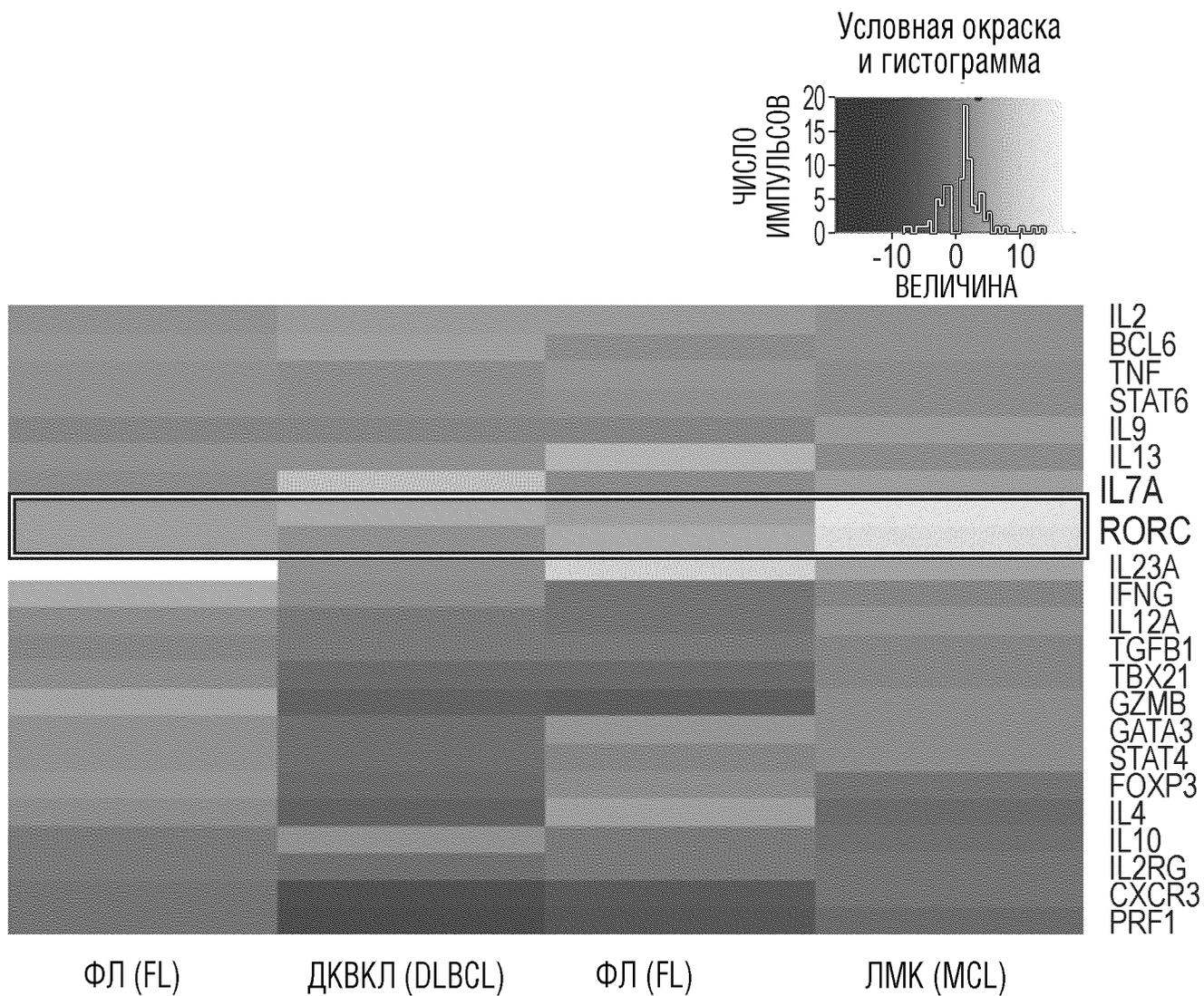


ФИГ.20D



ФИГ.21

ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА



ФИГ.22 Способ 2А – 22 дня на способ, 2–3 дня на сбор и доставку



ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА

22/49

ФИГ.23

Способ 2А : приблизительно 22 суток на этапы А-Е

1. ЭТАП А

Получение образца опухоли пациента

2. ЭТАП В

Фрагментирование и первое размножение
от 3 суток до 14 суток

3. ЭТАП С

Переход от первого размножения ко второму
размножению

Без хранения и замкнутой системы

4. ЭТАП D

Второе размножение

IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие питающие клетки

Замкнутая система

5. ЭТАП Е

Сбор ОИЛ с Этапа D

Замкнутая система

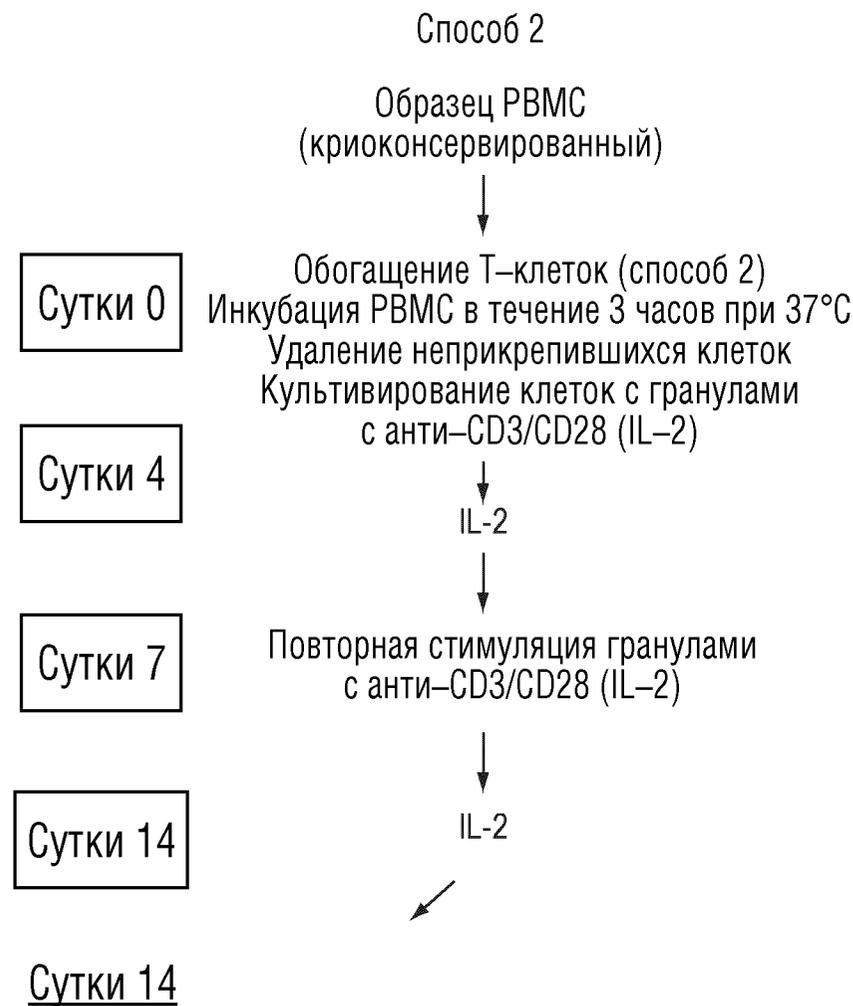
6. ЭТАП F

Окончательное формулирование в продукт и перенос в
пакет для инфузий (по желанию криоконсервирование)

ФИГ.24А



ФИГ.24В

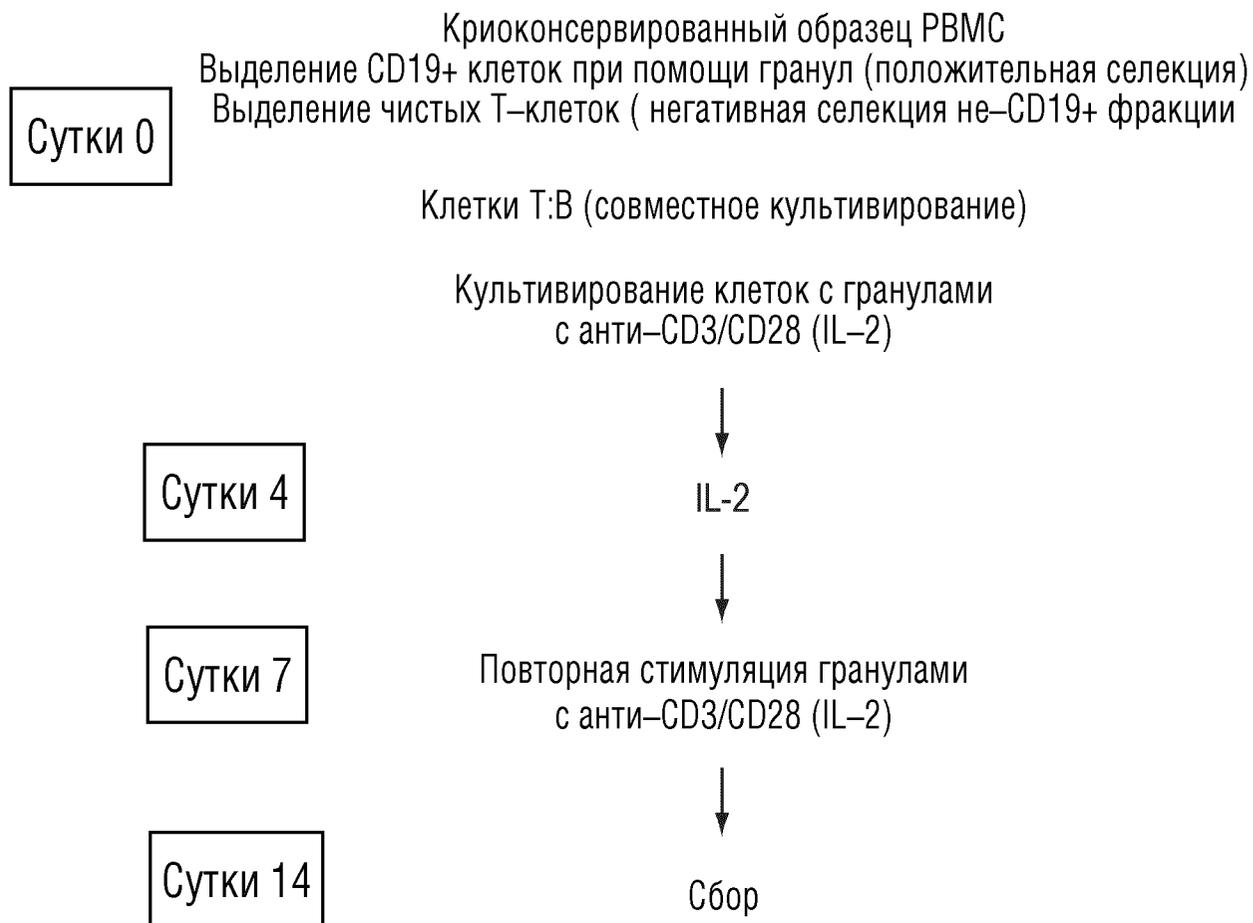


ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА

24/49

ФИГ.24С

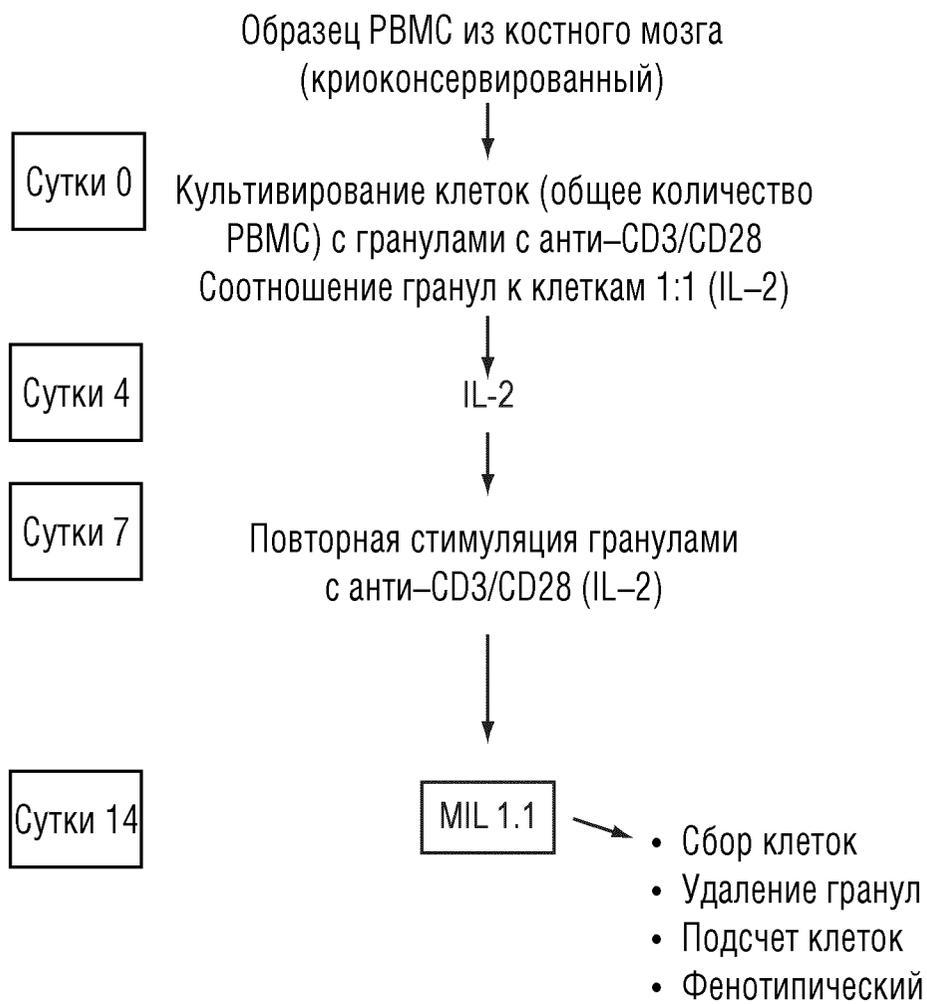
Способ 3



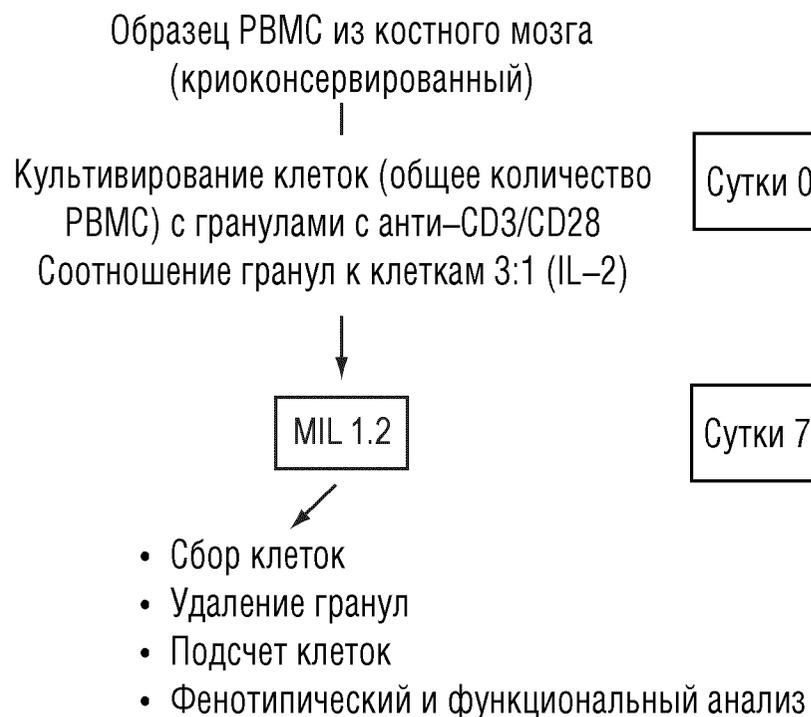
ФИГ.25А

ФИГ.25В

Способ 1

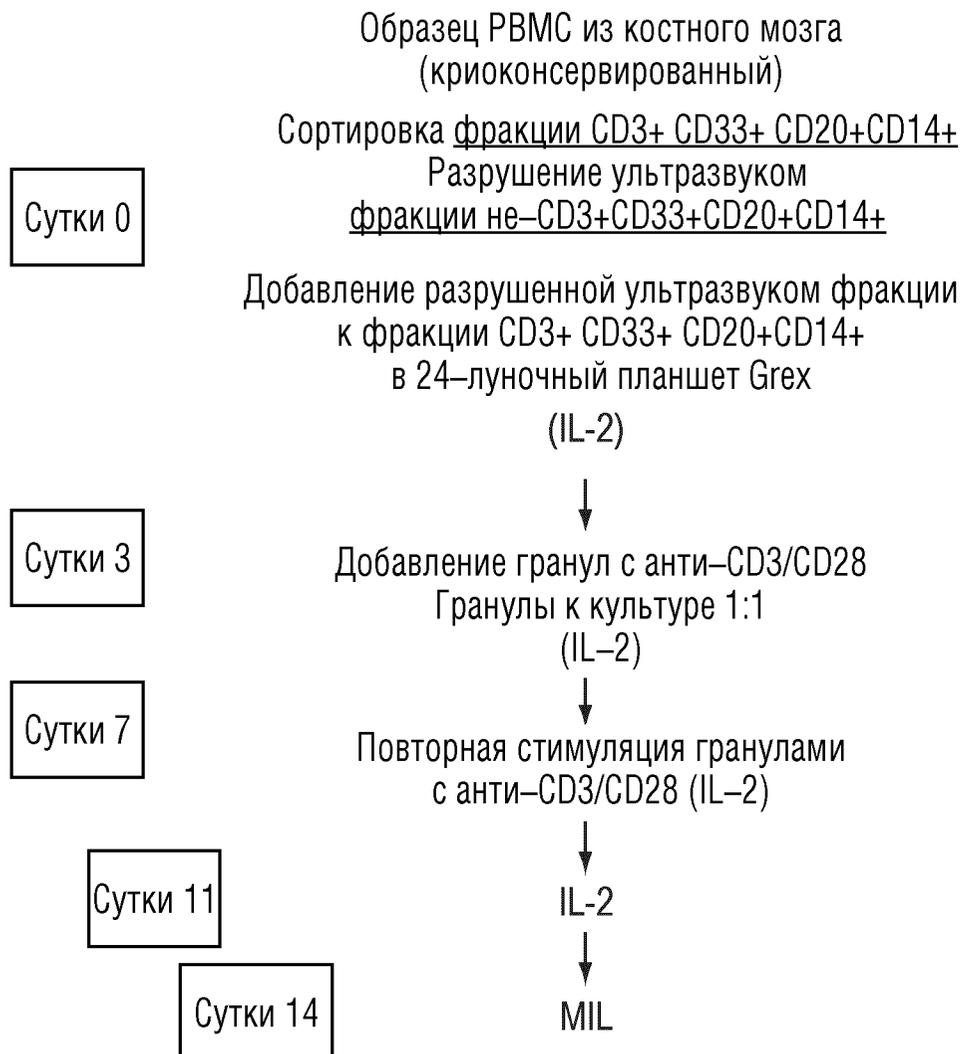


Способ 2

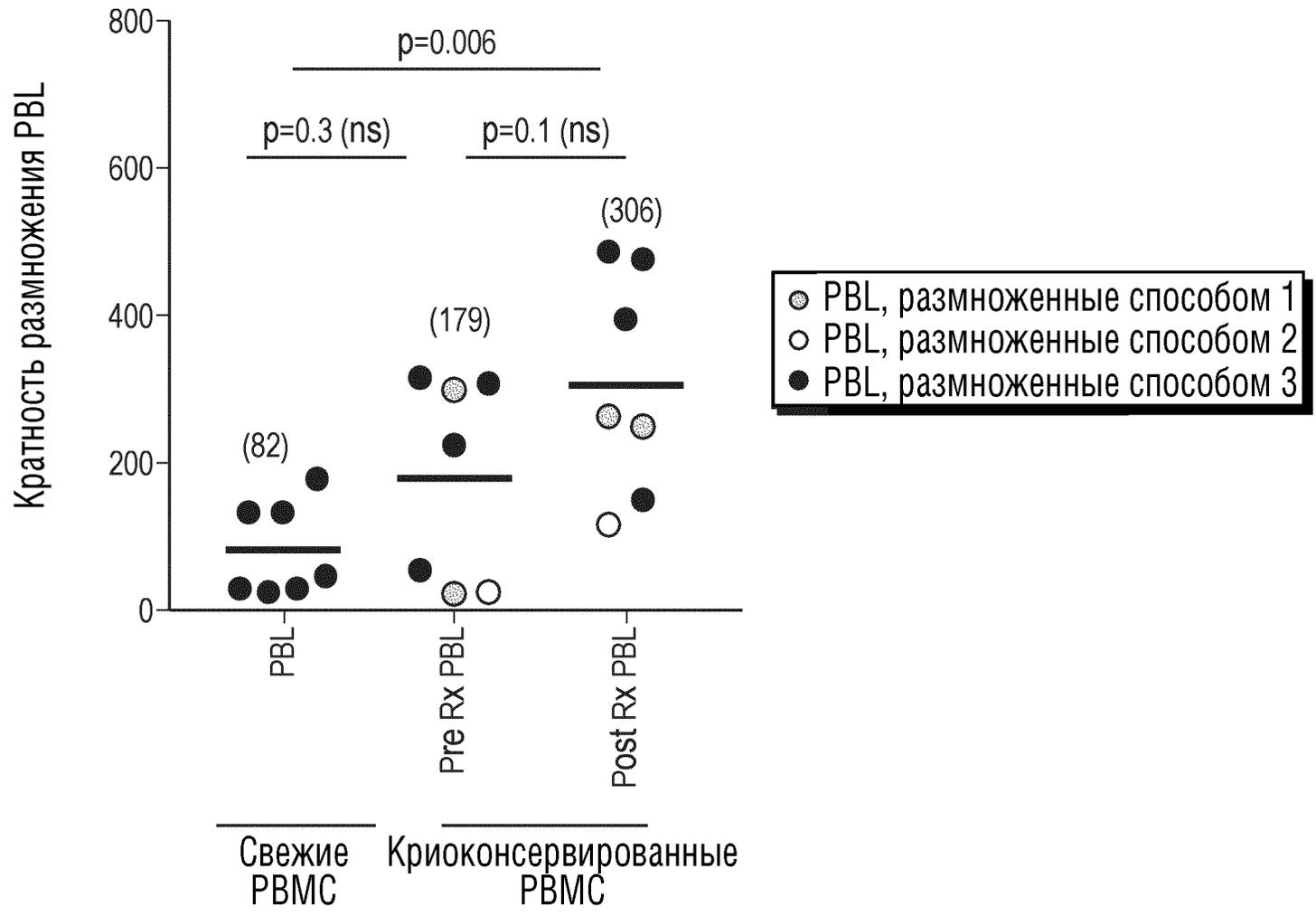


ФИГ.25С

Способ 3

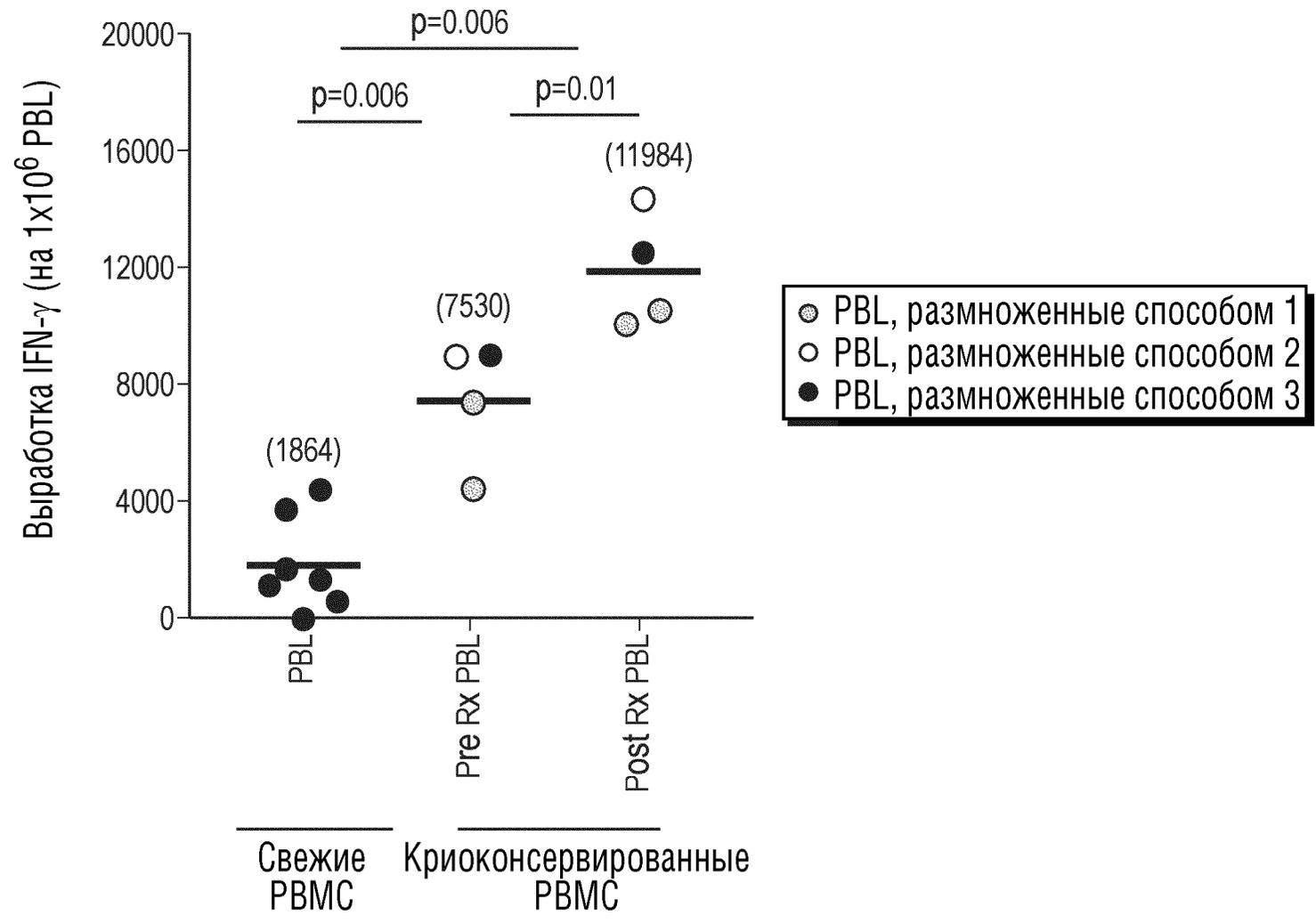


ФИГ.26

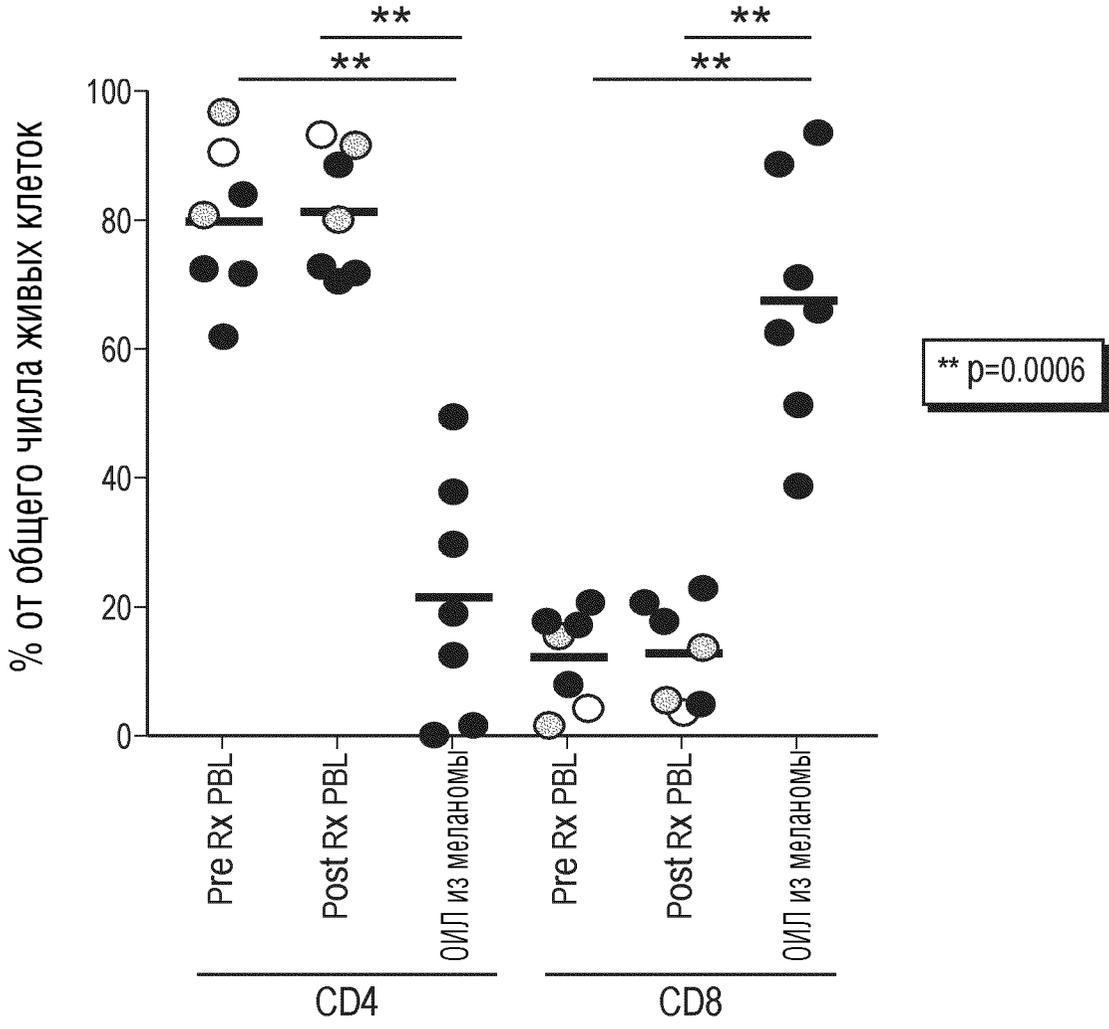


ФИГ.27

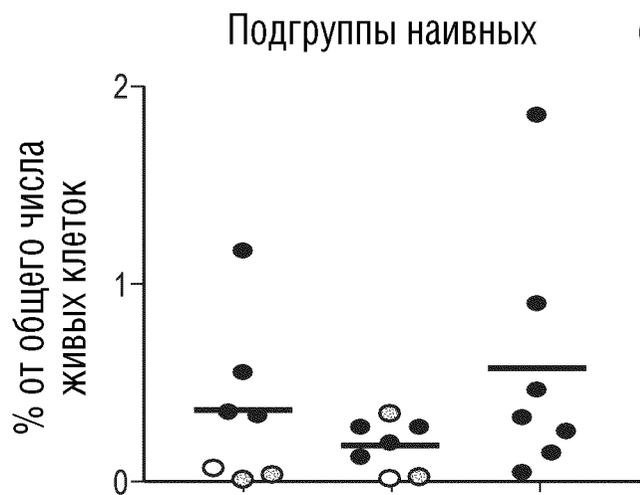
ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА



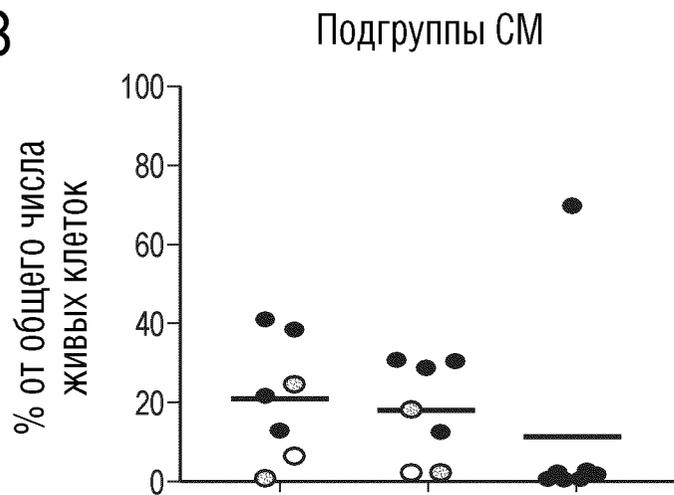
ФИГ.28



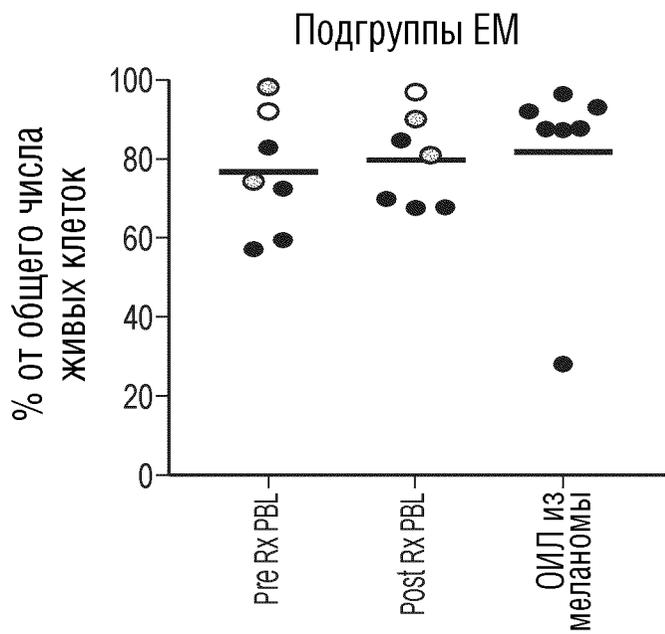
ФИГ.29А



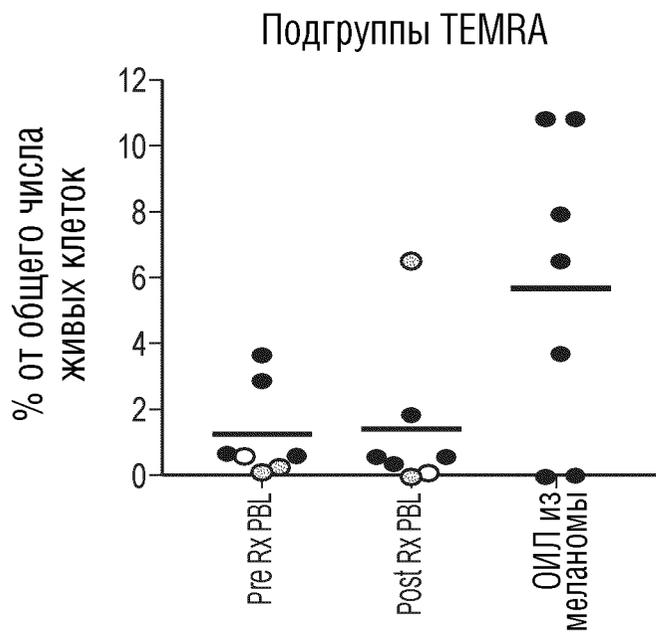
ФИГ.29В



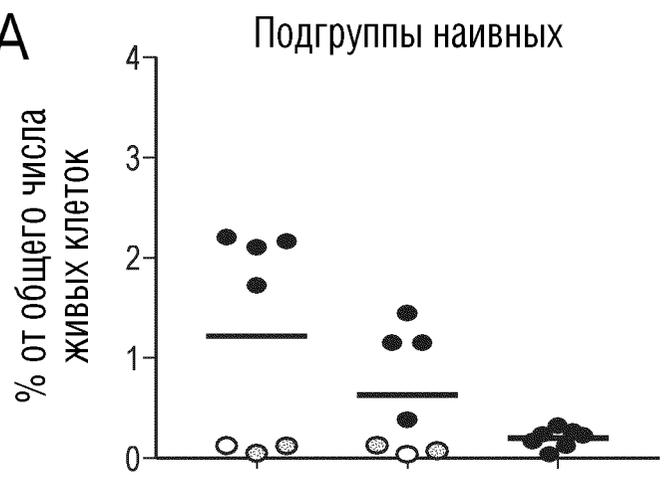
ФИГ.29С



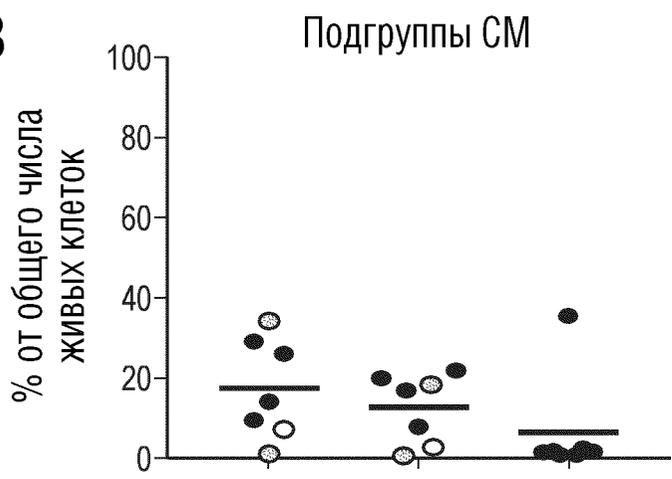
ФИГ.29D



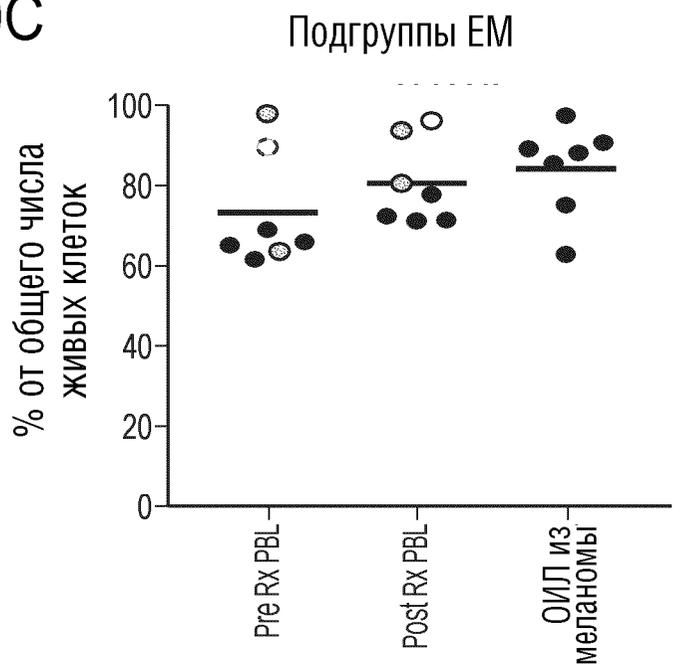
ФИГ.30А



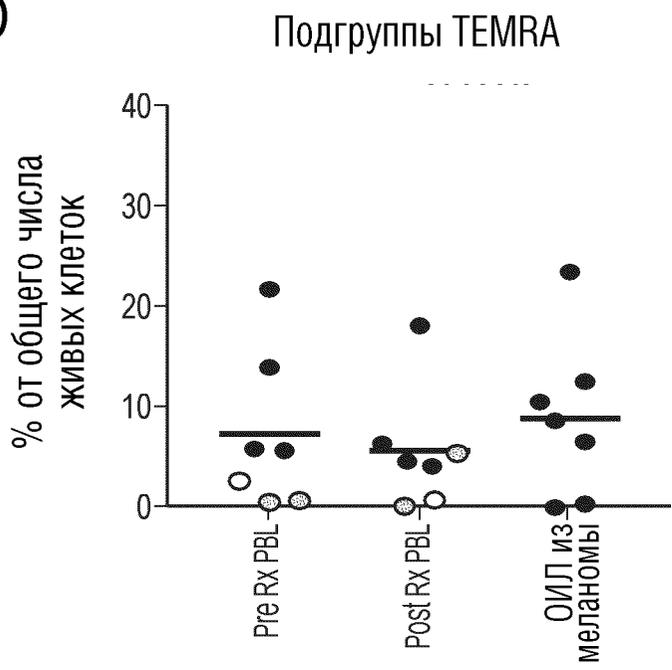
ФИГ.30В



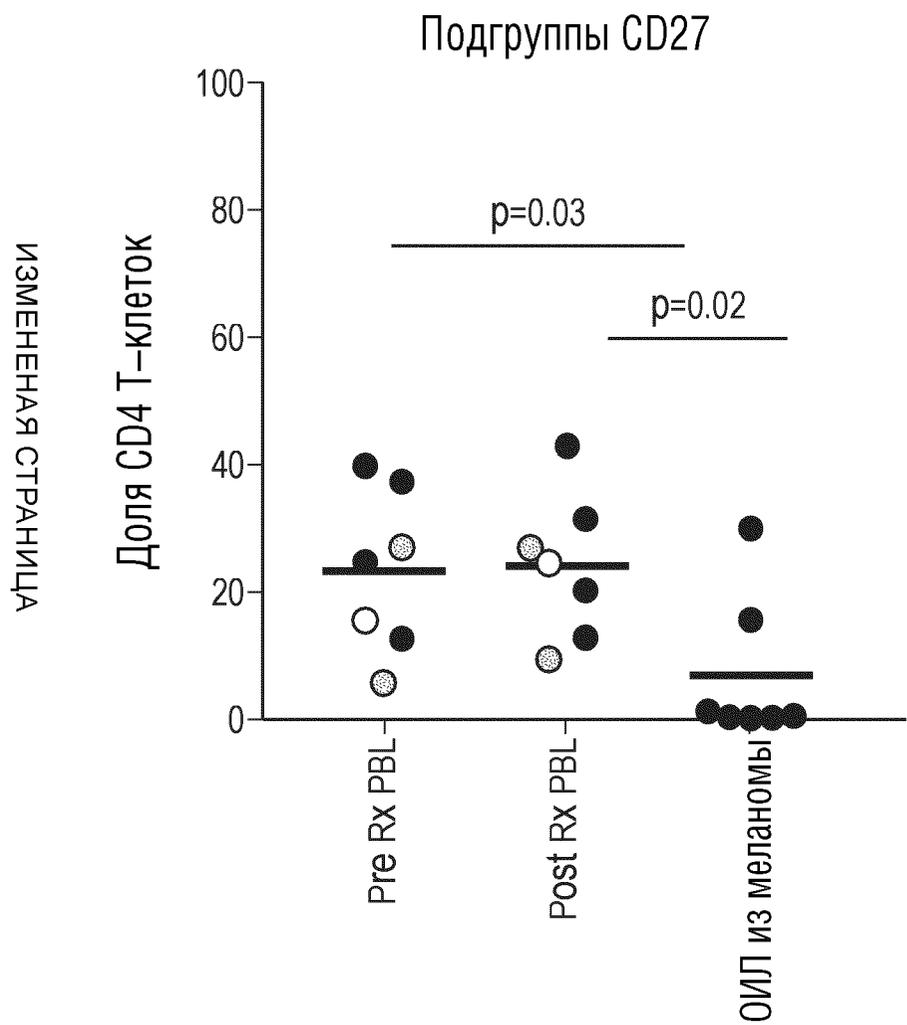
ФИГ.30С



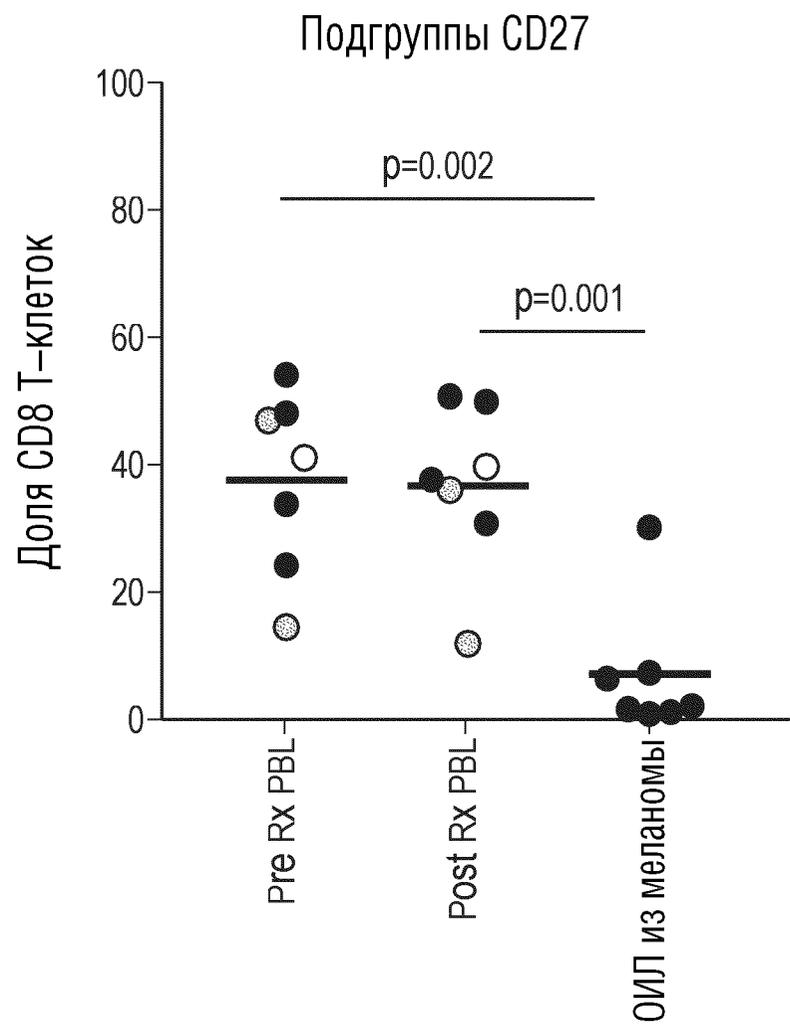
ФИГ.30D



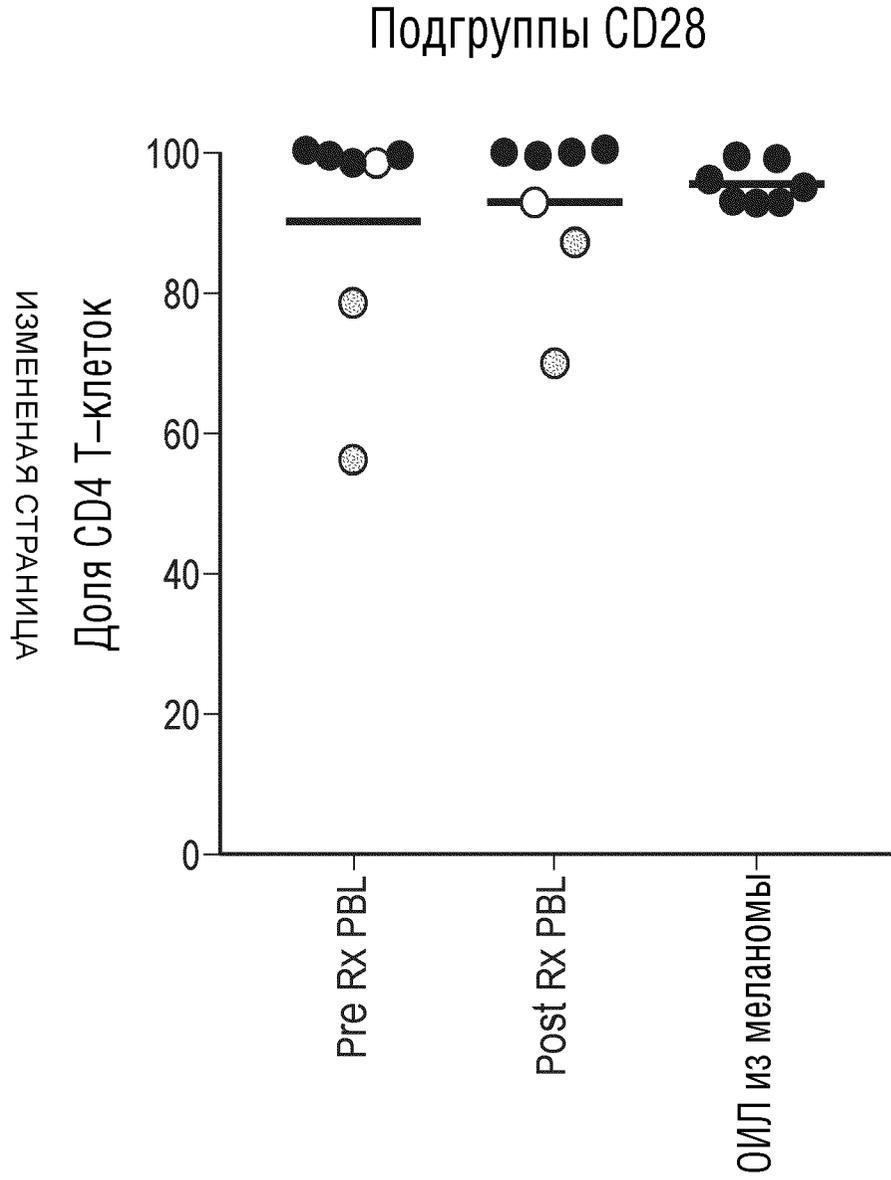
ФИГ.31А



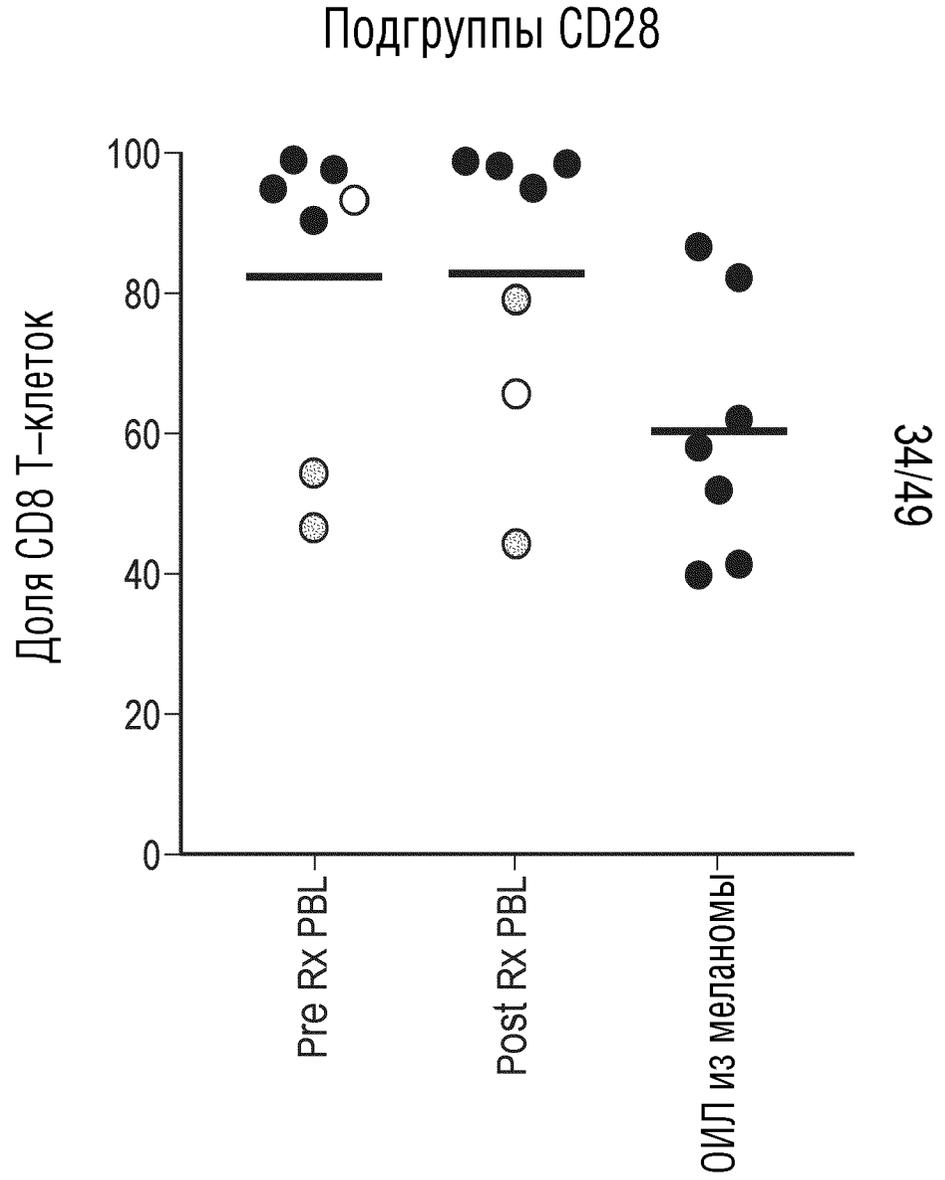
ФИГ.31В



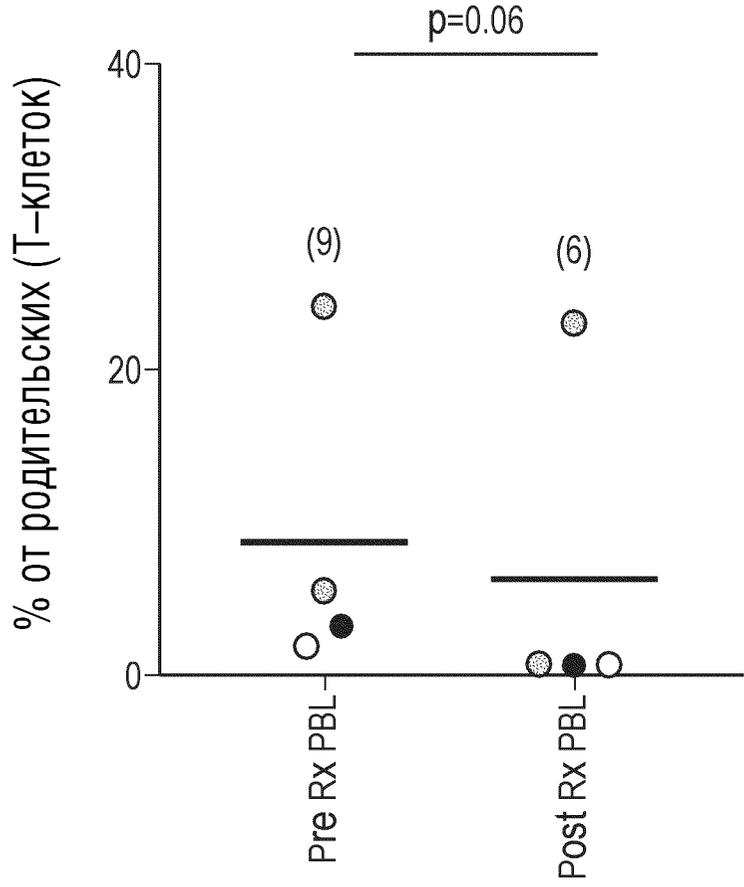
ФИГ.32А



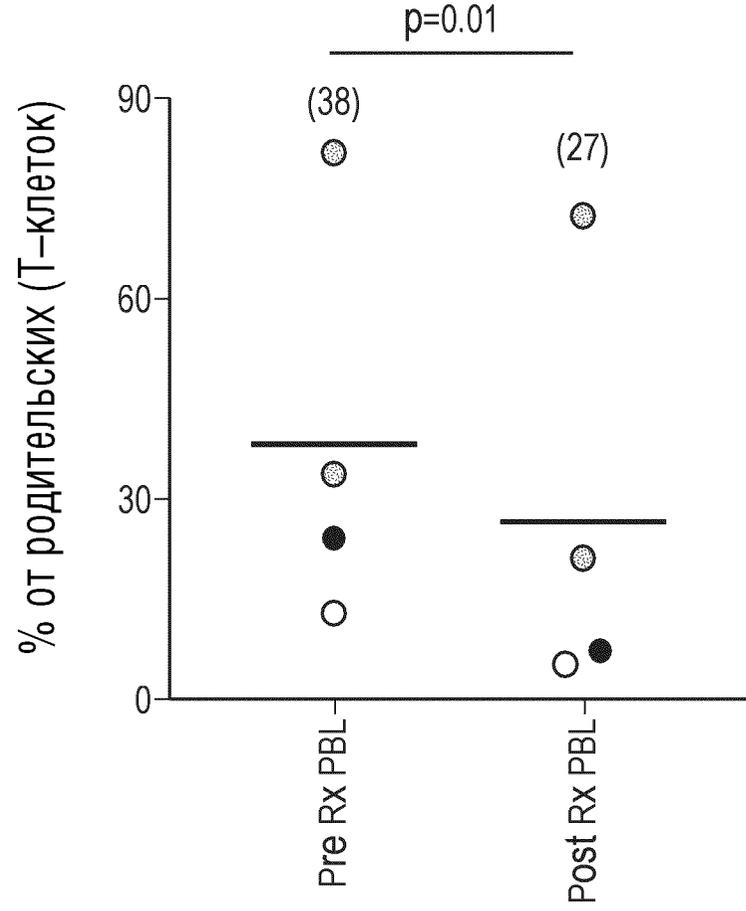
ФИГ.32В



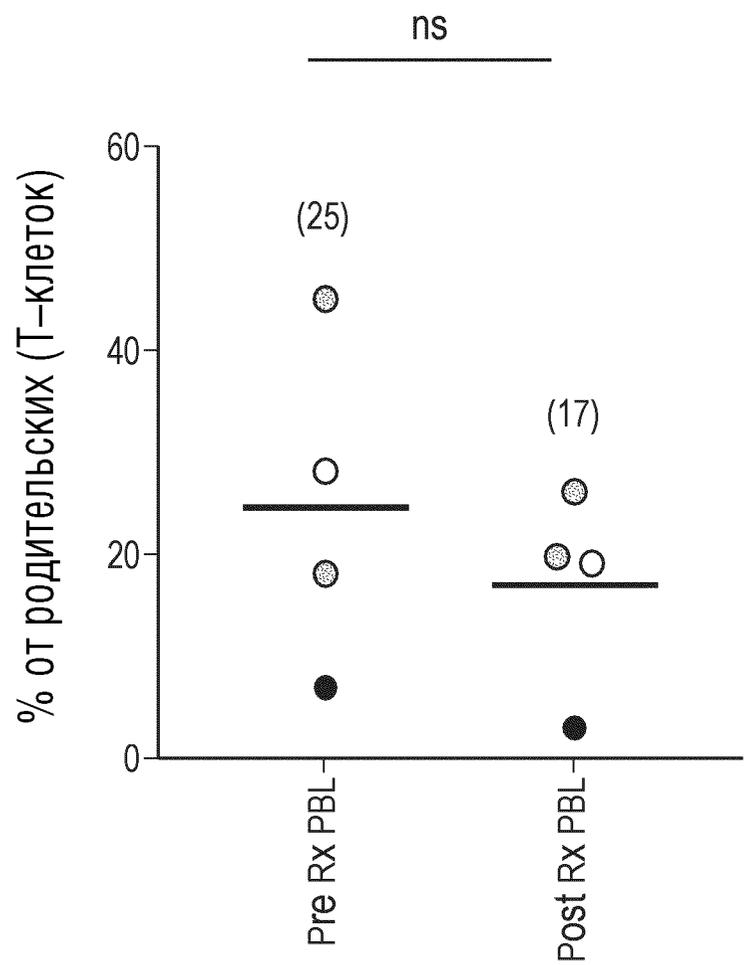
ФИГ.33А



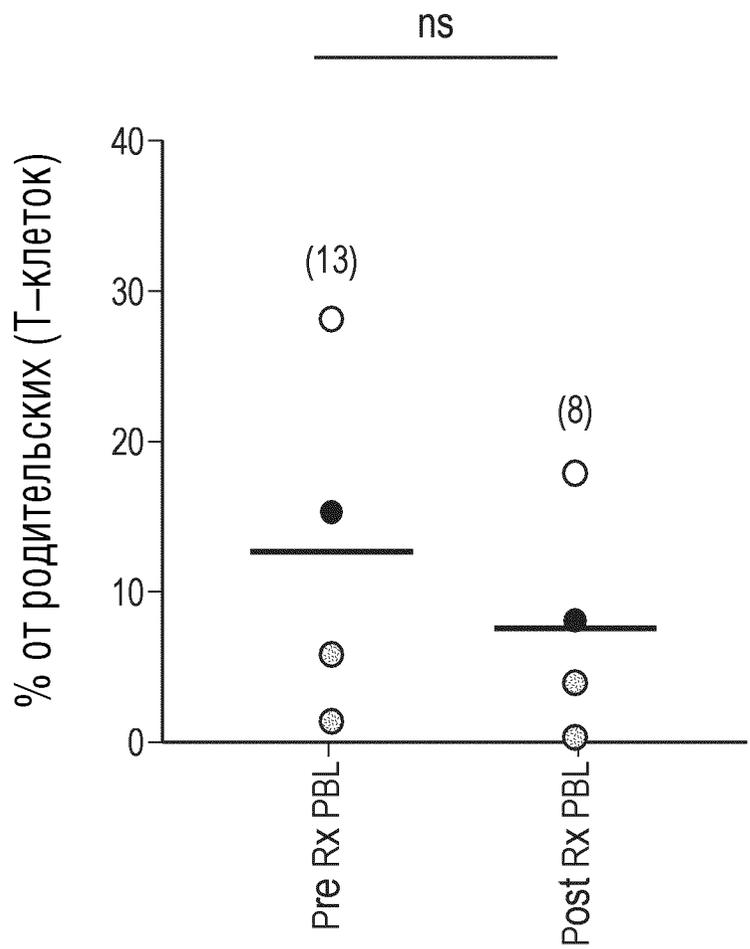
ФИГ.33В



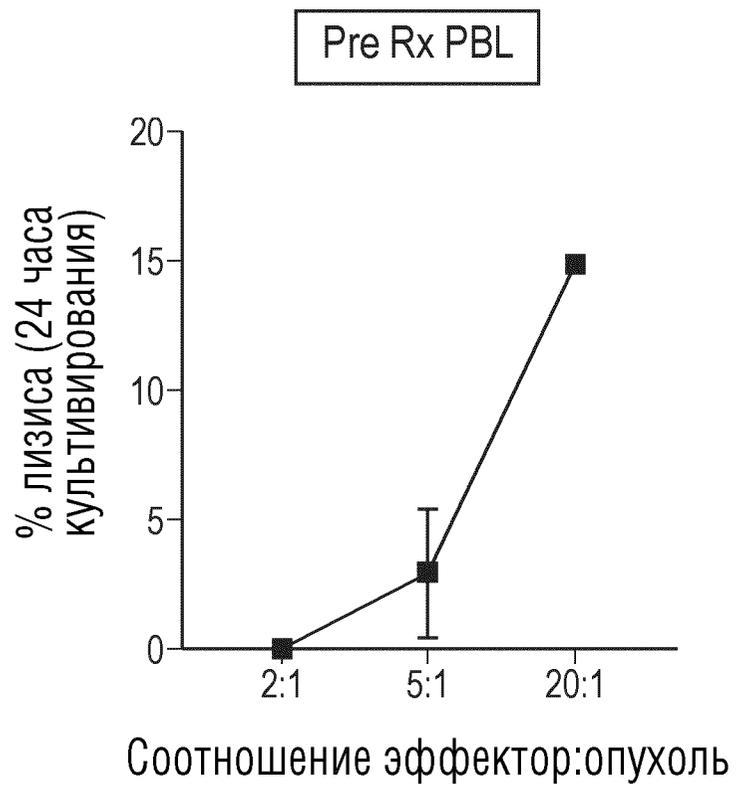
ФИГ.34А



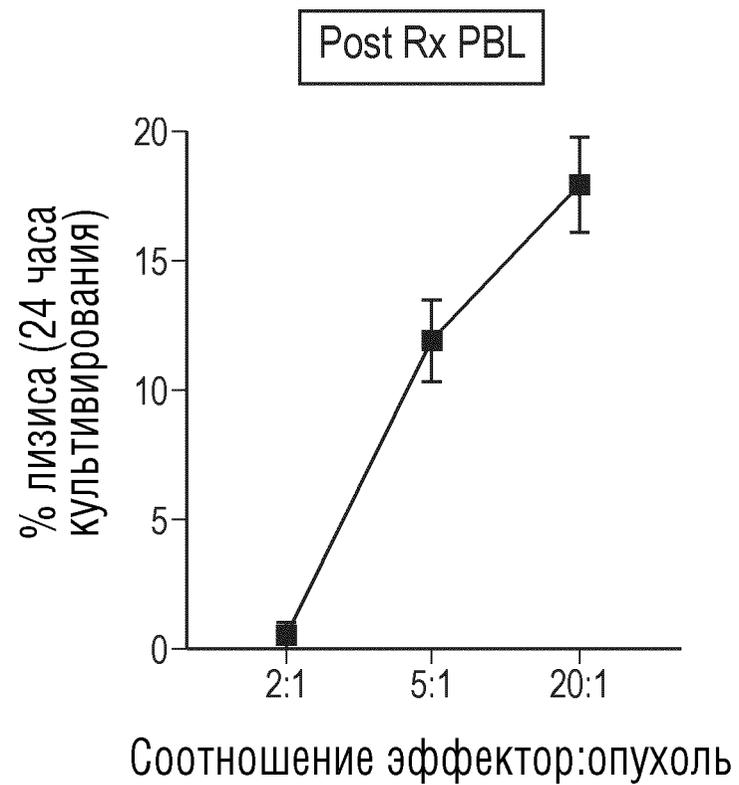
ФИГ.34В



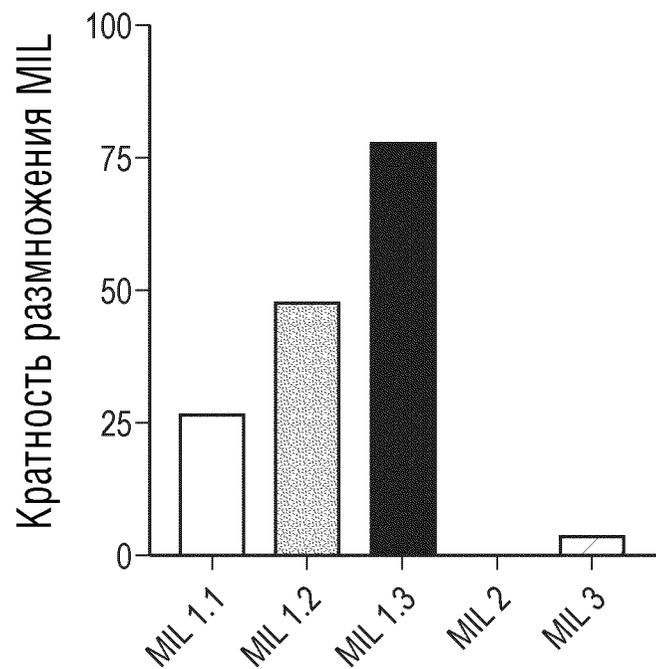
ФИГ.35А



ФИГ.35В



ФИГ.36А



MIL 1

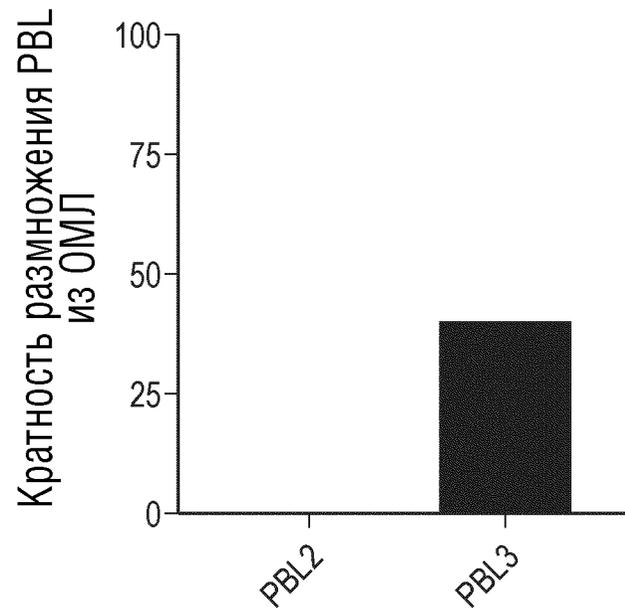
Начальное число клеток

MIL 1.3: 138,000 клеток

MIL2: 62,000 клеток

MIL3: 28,000 клеток

ФИГ.36В

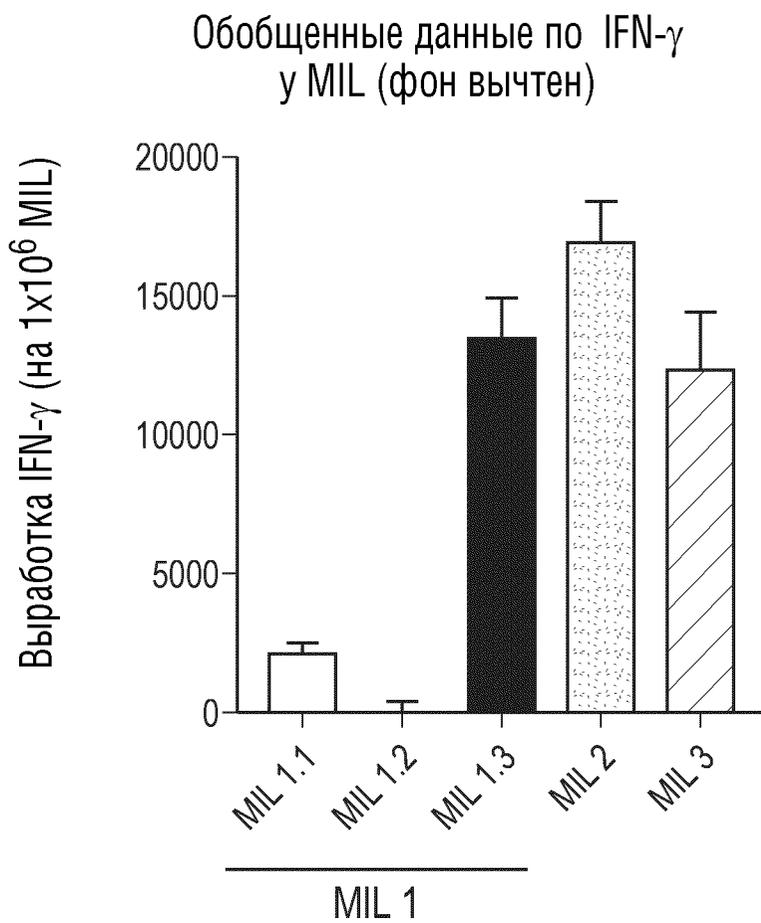


Начальное число клеток

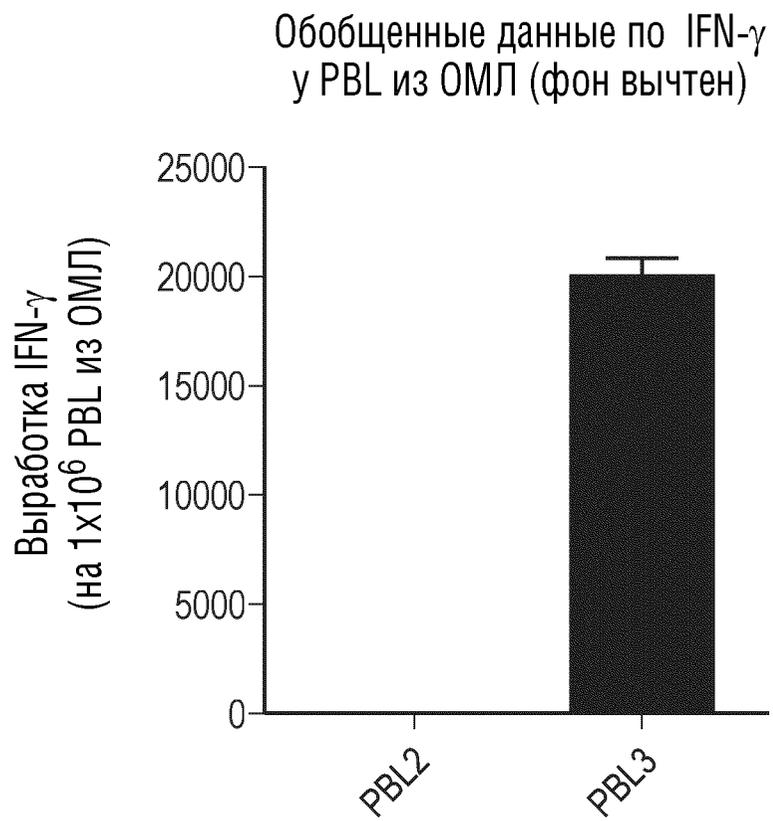
PBL2: 338,000 клеток

PBL3: 336,000 клеток

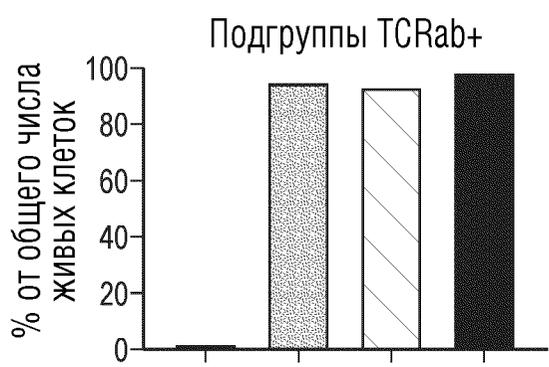
ФИГ.37А



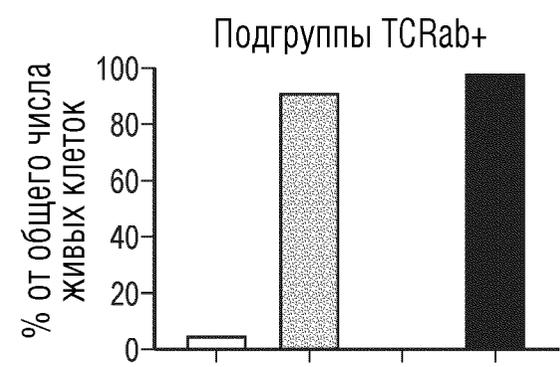
ФИГ.37В



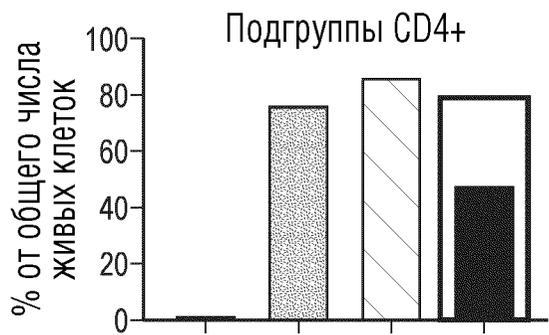
ФИГ.38А



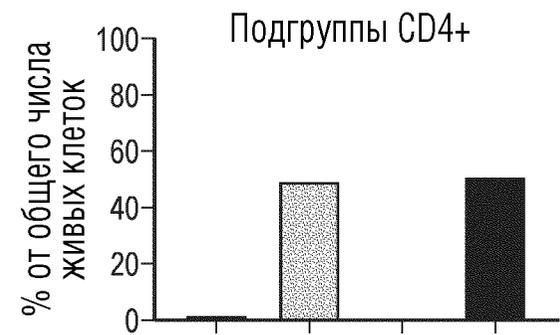
ФИГ.38D



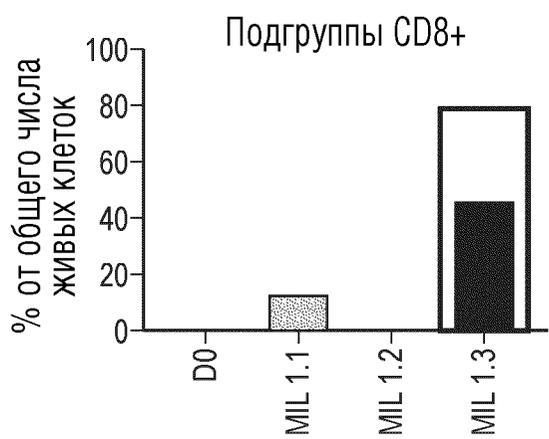
ФИГ.39В



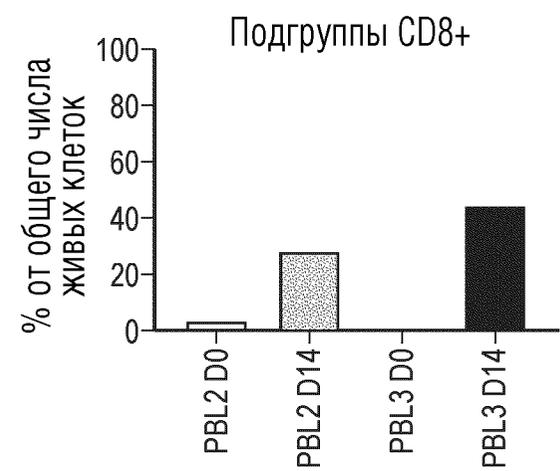
ФИГ.39Е



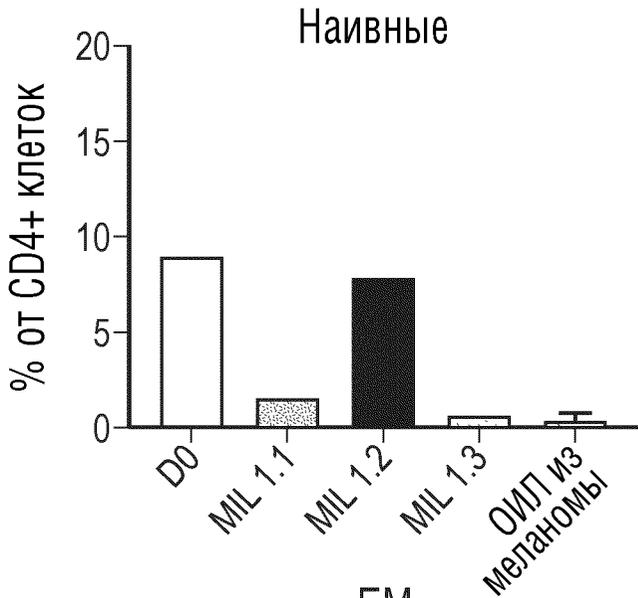
ФИГ.38С



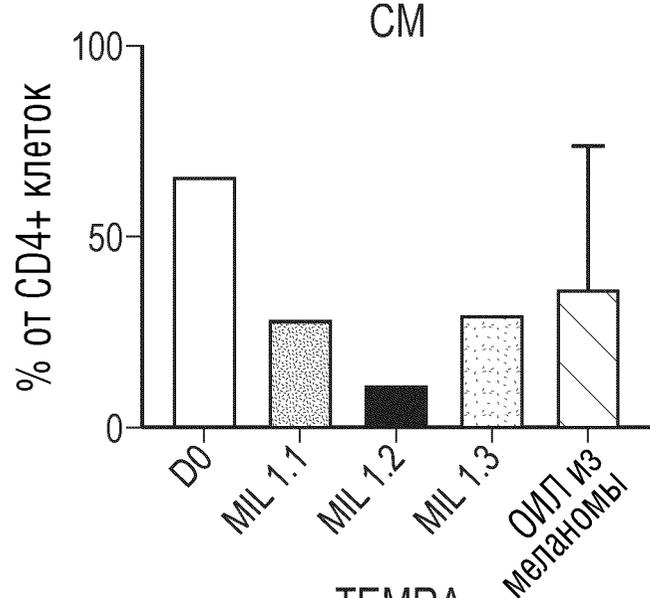
ФИГ.38F



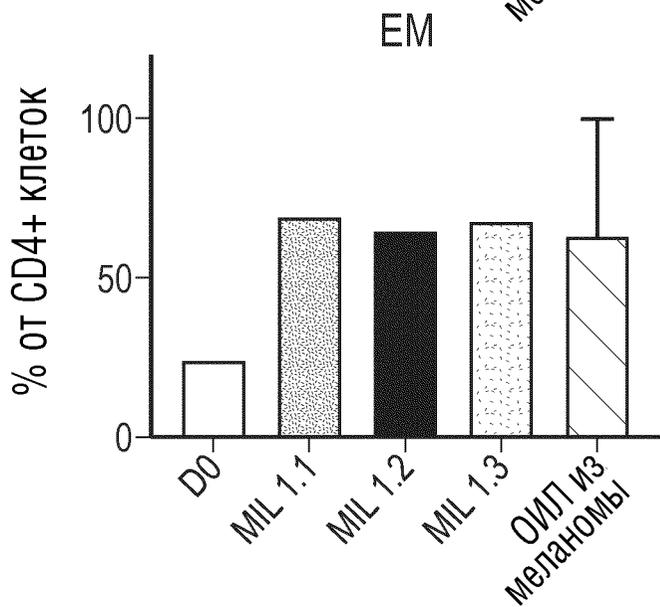
ФИГ.39А



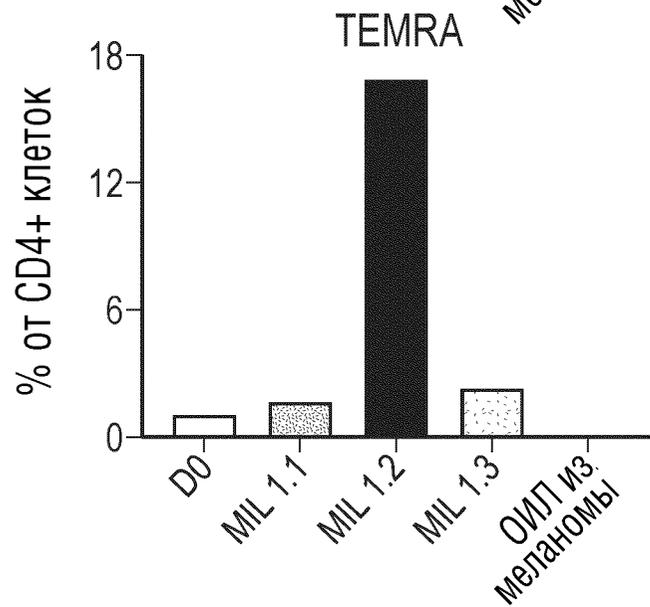
ФИГ.39В



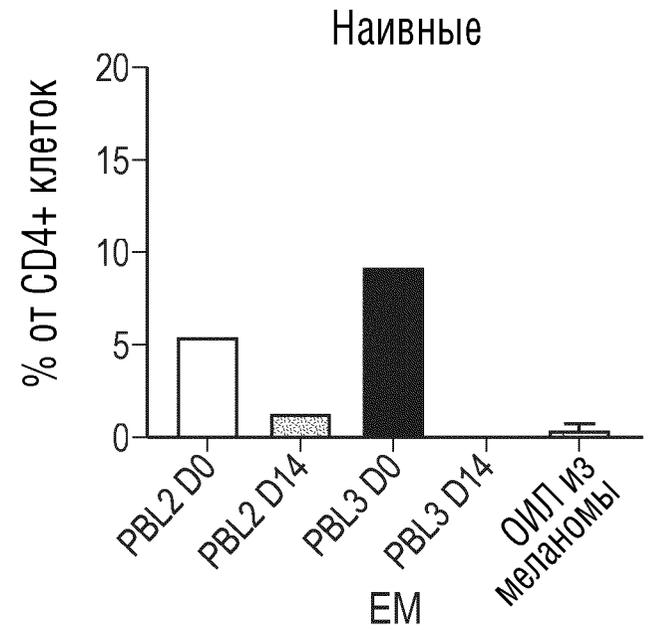
ФИГ.39С



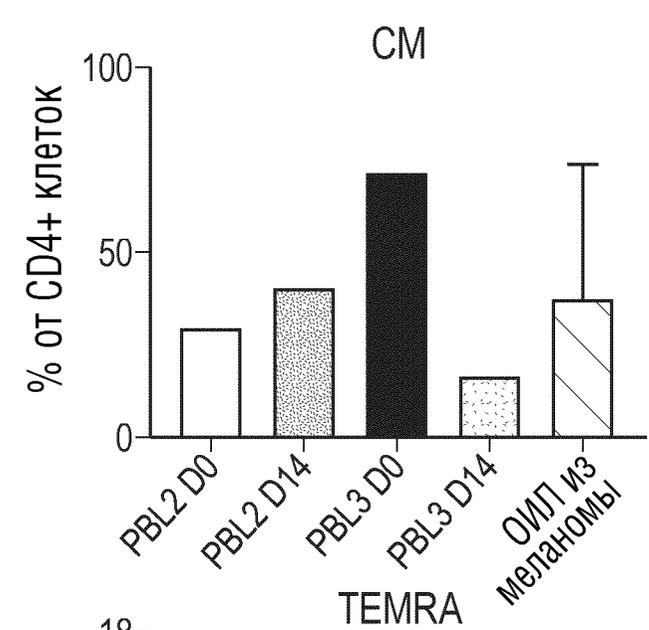
ФИГ.39D



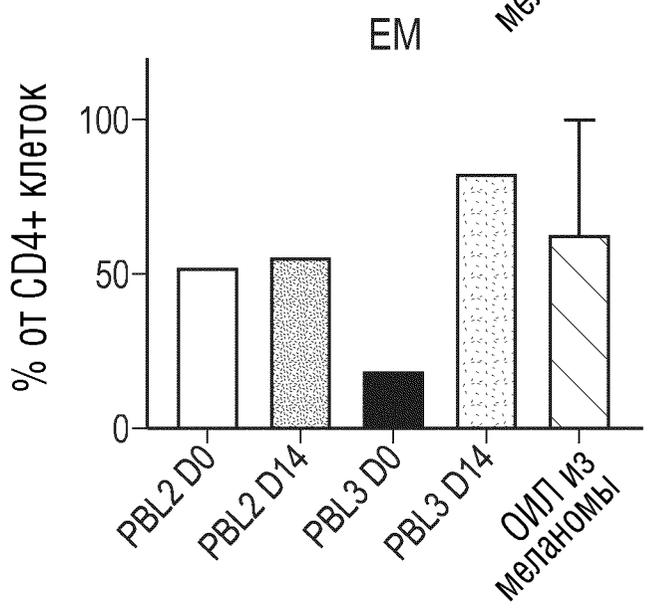
ФИГ.40А



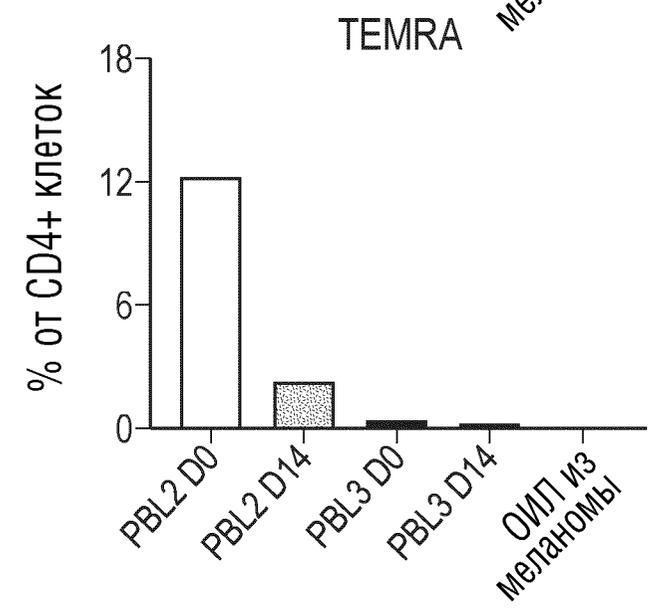
ФИГ.40В



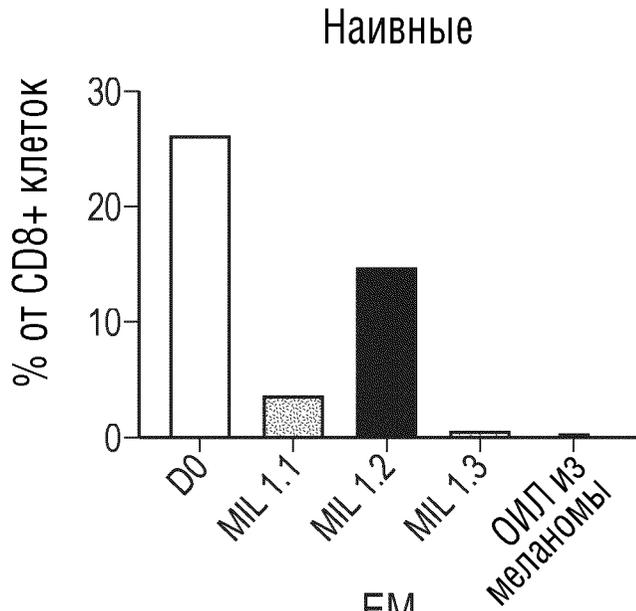
ФИГ.40С



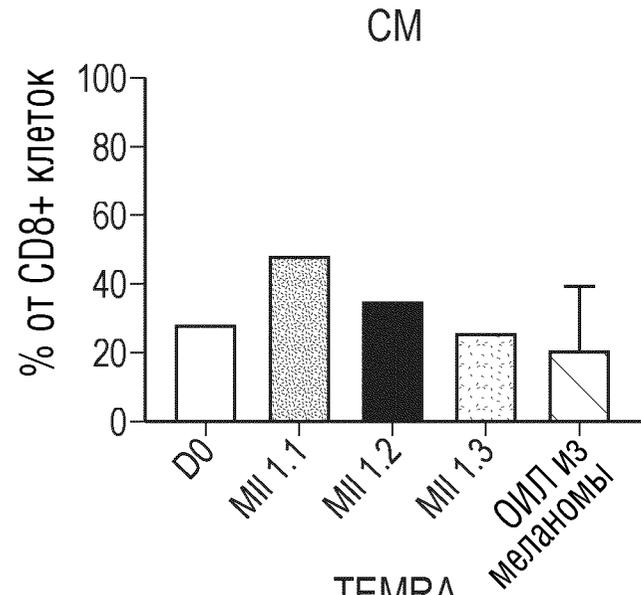
ФИГ.40D



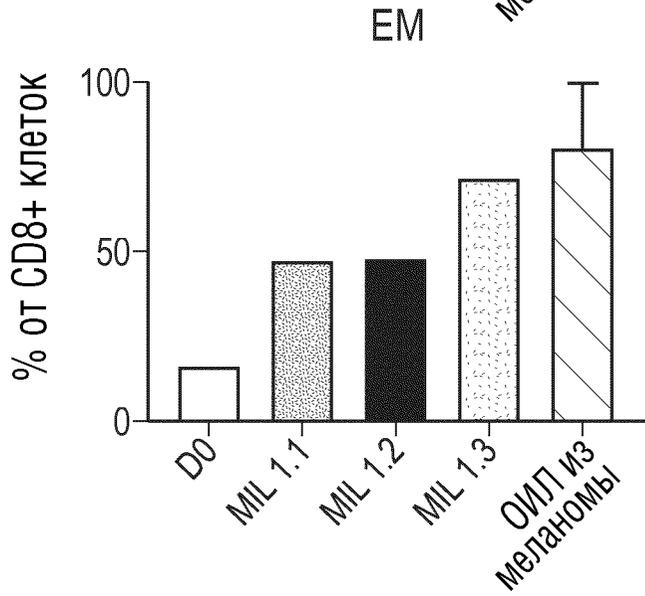
ФИГ.41А



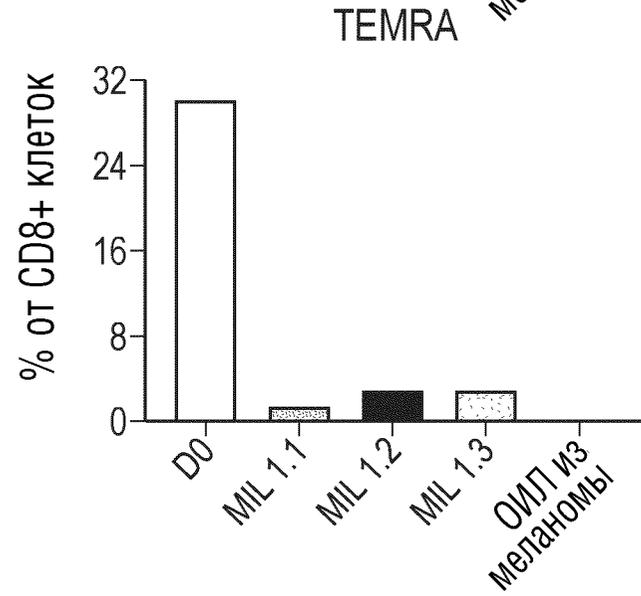
ФИГ.41В



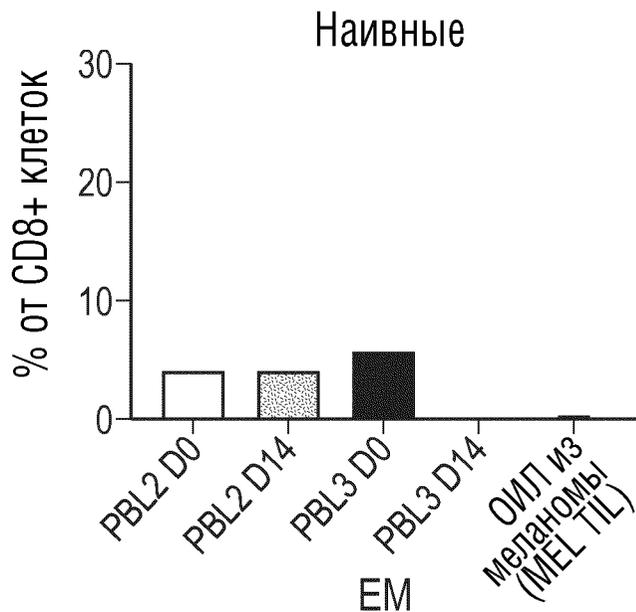
ФИГ.41С



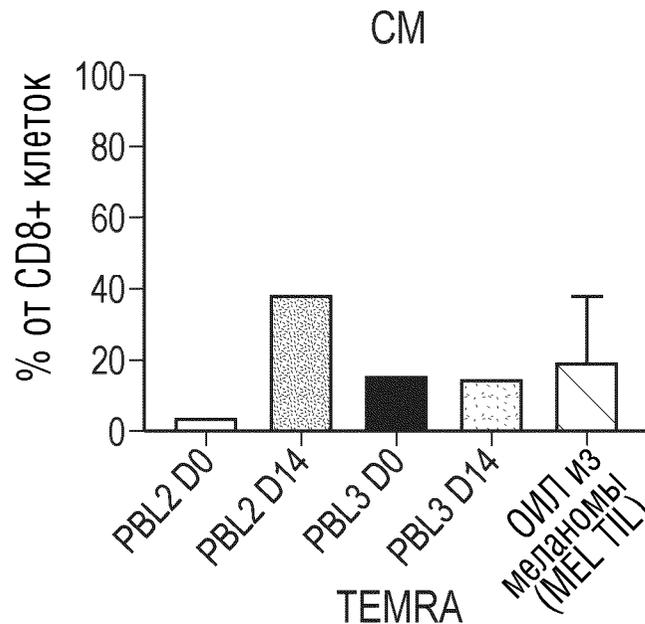
ФИГ.41D



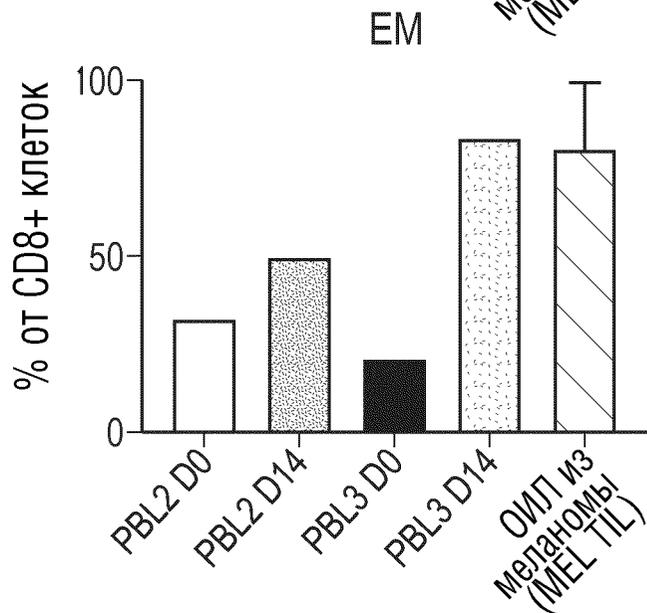
ФИГ.42А



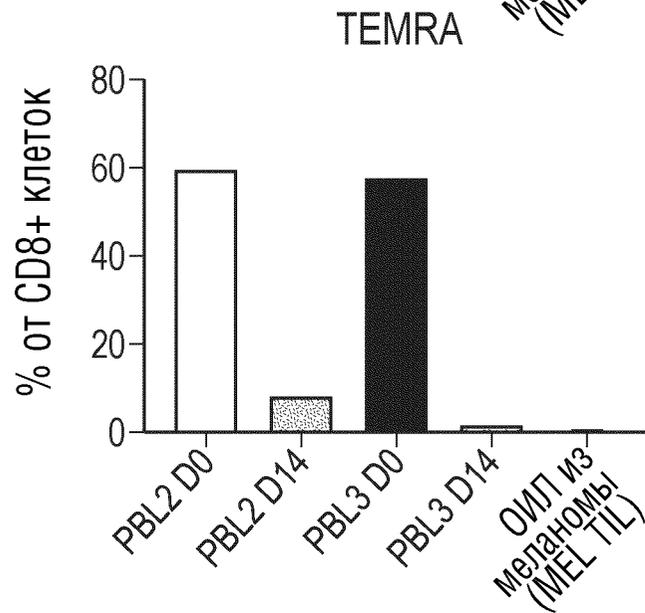
ФИГ.42В



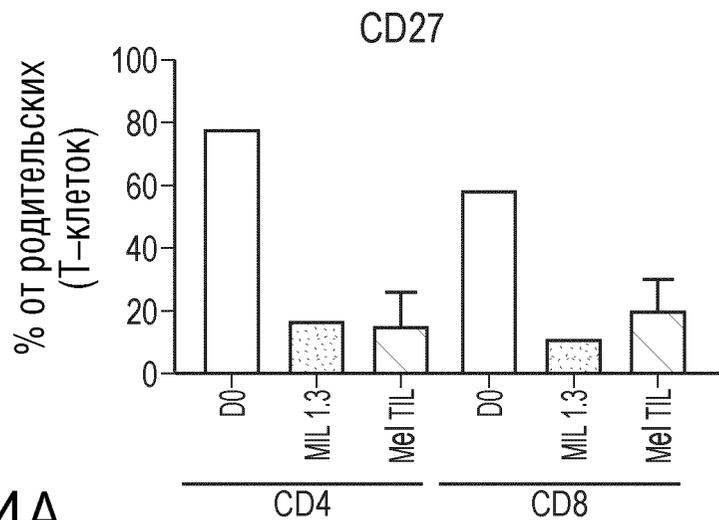
ФИГ.42С



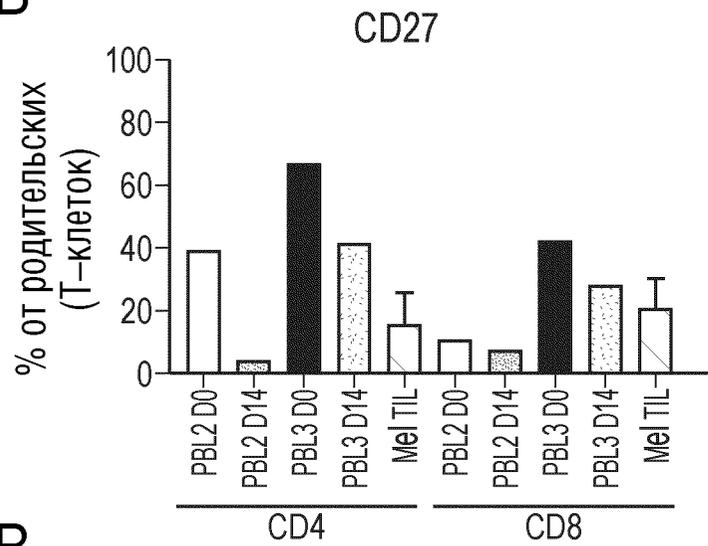
ФИГ.42D



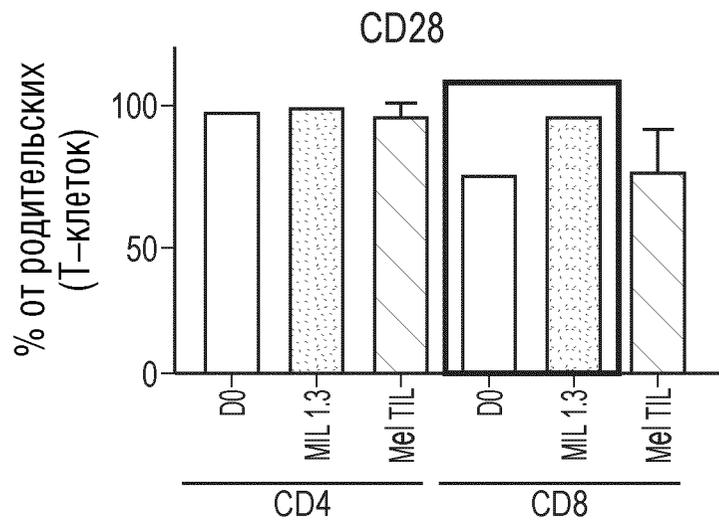
ФИГ.43А



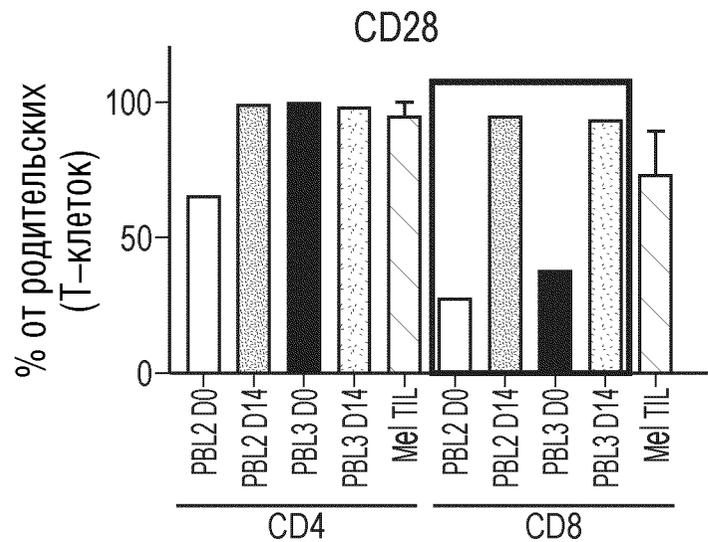
ФИГ.43В



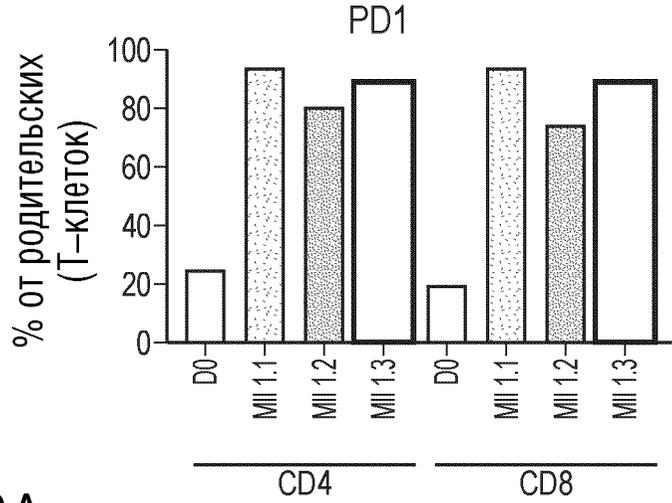
ФИГ.44А



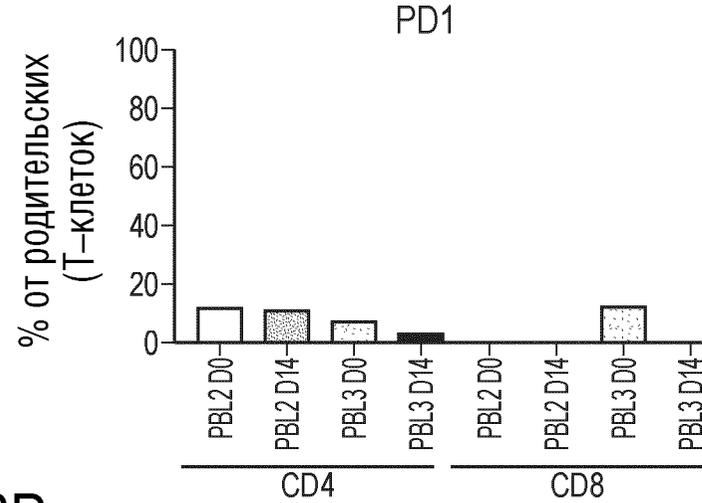
ФИГ.44В



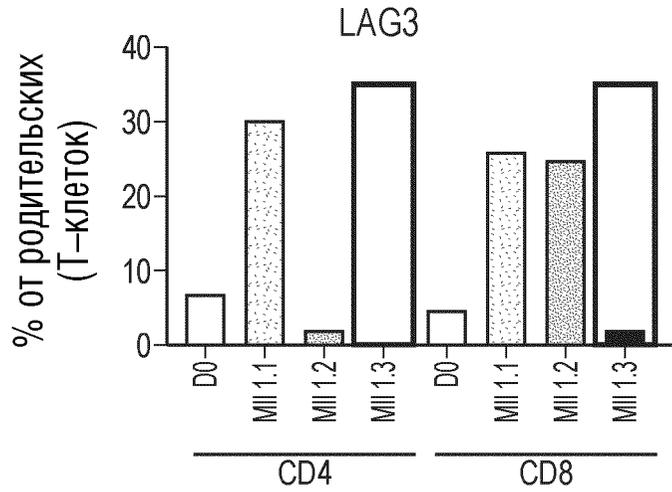
ФИГ.45А



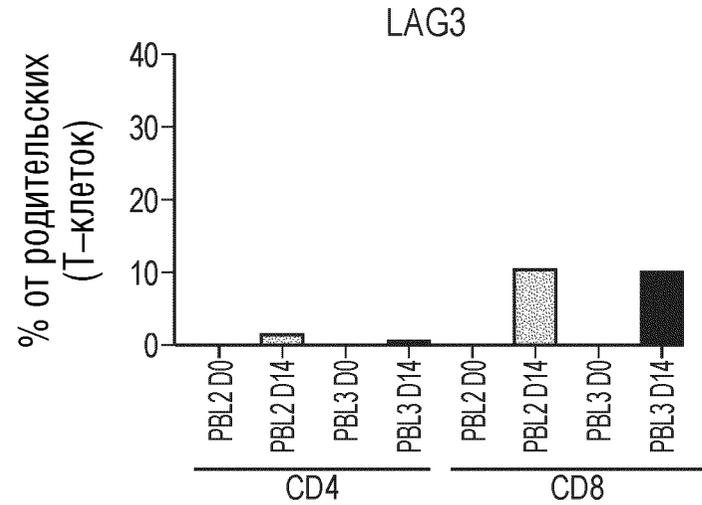
ФИГ.45В



ФИГ.46А

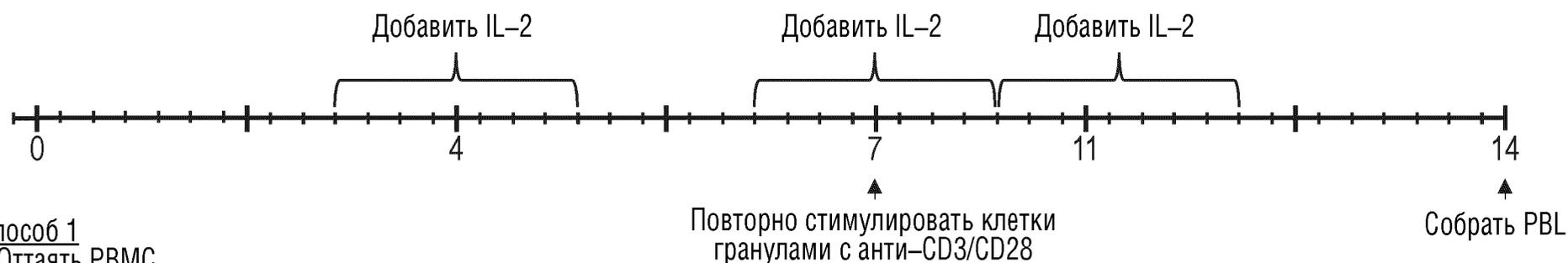


ФИГ.46В



ФИГ.47

Временная шкала – способ размножения PBL из ХЛЛ



Способ 1

- Оттаять PVMC
- Выделить T-клетки (способ с гранулами - негативная селекция)
- Культивировать T-клетки только в присутствии гранул с анти-CD3/CD28 (соотношение 1:1) и IL-2

Способ 3

- Оттаять PVMC
- Выделить CD19+ B-клетки (способ с гранулами – положительная селекция)
- Выделить T-клетки (способ с гранулами – негативная селекция)
- Совместно культивировать T-клетки и B-клетки в присутствии гранул с анти-CD3/CD28 (соотношение 1:1) и IL-2

ФИГ.48

Временная шкала – способ размножения MIL из ОМЛ

ИЗМЕНЕНАЯ СТРАНИЦА

