

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091666** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.12.10

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

(22) Дата подачи заявки
2019.01.08

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОИЛ, ОБОГАЩЕННЫХ СПЕЦИФИЧЕСКИМИ
ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ Т-КЛЕТКАМИ**

(31) 62/614,887; 62/664,034; 62/669,319;
62/697,921; 62/734,868; 62/773,715

(32) 2018.01.08; 2018.04.27; 2018.05.09;
2018.07.13; 2018.09.21; 2018.11.30

(33) US

(86) PCT/US2019/012729

(87) WO 2019/136456 2019.07.11

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

(72) Изобретатель:
**Шартье-Курто Сесиль, Риттхипичай
Крит (US)**

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

(57) Настоящее изобретение относится к усовершенствованным и/или сокращенным процессам и способам для перепрограммирования ОИЛ с целью получения терапевтических популяций ОИЛ с повышенной терапевтической эффективностью. Такие перепрограммированные ОИЛ находят применение в терапевтических режимах лечения.

202091666
A1

202091666

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563970EA/55

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ ОИЛ, ОБОГАЩЕННЫХ СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ДЛЯ ОПУХОЛЕВЫХ АНТИГЕНОВ Т-КЛЕТКАМИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании предварительной патентной заявки США № 62/614887, поданной 8 января 2018 г., предварительной патентной заявки США № 62/664034, поданной 27 апреля 2018 г., предварительной патентной заявки США № 62/669319, поданной 9 мая 2018 г., предварительной патентной заявки США № 62/697921, поданной 13 июля 2018 г., предварительной патентной заявки США № 62/734868, поданной 21 сентября 2018 г., и предварительной патентной заявки США № 62/773715, поданной 30 ноября 2018 г., полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в настоящую заявку посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия в формате ASCII, созданная 7 января 2019 г., имеет название 116983-5034-WO_ST25.txt и размер 122 килобайт.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Лечение генерализованных, рефрактерных форм рака с использованием адоптивного переноса опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) представляет собой эффективный подход к терапии пациентов, имеющих неблагоприятный прогноз. Gattinoni, et al., *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 383-393. Для успешной иммунотерапии необходимо большое количество ОИЛ, и для коммерциализации данного подхода необходим функциональный и надежный способ. Разработка такого способа была труднодостижимой из-за технических, логистических и нормативных проблем, связанных с размножением клеток. Размножение ОИЛ с применением ИЛ-2, с последующим «процессом быстрого размножения» (ПБР), стало предпочтительным способом размножения ОИЛ благодаря скорости и эффективности процесса. Dudley, et al., *Science* **2002**, 298, 850-54; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346-57; Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-39; Riddell, et al., *Science* **1992**, 257, 238-41; Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42. ПБР может приводить к 1000-кратному увеличению количества ОИЛ в течение 14-дневного периода, хотя для этого необходим большой избыток (например, 200-кратный) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК, также известных как мононуклеарные клетки (МК)), часто от многих доноров, в качестве питающих клеток, а также анти-CD3 антитело (ОКТ3) и высокие дозы ИЛ-2. Dudley, et al., *J. Immunother.* **2003**, 26, 332-42. ОИЛ, прошедшие процедуру ПБР, обеспечили успешное проведение адоптивной клеточной терапии после иммуносупрессии хозяина у пациентов с меланомой.

[0004] Существует острая потребность в более действенных или эффективных

способах производства ОИЛ и методах терапии, основанных на таких способах, которые подходят для промышленного масштаба производства и нормативного утверждения с целью использования для пациентов-людей во многих клинических центрах. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность за счет предложения способов временной генетической модификации для перепрограммирования ОИЛ с целью получения терапевтических популяций ОИЛ с повышенной терапевтической эффективностью.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] Настоящее изобретение относится к усовершенствованным и/или сокращенным способам размножения ОИЛ и получения терапевтических популяций ОИЛ.

[0006] Настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему: (i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента; (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ; (iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и (iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

[0008] Настоящее изобретение также относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции

ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы.

[0009] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение дополнительного второго размножения до или после этапа (iv) путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции ОИЛ дополнительного IL-2, дополнительного ОКТ-3 и дополнительных АПК, при этом дополнительное второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней, с получением большей терапевтической популяции ОИЛ, чем популяция, полученная на этапе (iii), при этом большая терапевтическая популяция ОИЛ отличается изменением количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток.

[0010] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

[0011] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). В

некоторых вариантах осуществления МКПК являются облученными и аллогенными. В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d). В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[0013] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[0015] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

[0016] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 мм^3 до примерно 1500 мм^3 .

[0017] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм^3 .

[0018] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

[0019] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[0020] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток на этапе (d) дополнительно содержит IL-15 и/или IL-21.

[0021] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от примерно 10000 МЕ/мл до примерно 5000 МЕ/мл.

[0022] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет от примерно 500 МЕ/мл до примерно 100 МЕ/мл.

[0023] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-21 составляет от примерно 20 МЕ/мл до примерно 0,5 МЕ/мл.

[0024] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой НуроThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[0025] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО). В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% диметилсульфоксида (ДМСО).

[0026] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0027] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

[0028] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение

периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

[0029] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

[0030] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 15 дней до примерно 20 дней.

[0031] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

[0032] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

[0033] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее.

[0034] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 20 дней или менее.

[0035] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 15 дней или менее.

[0036] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 10 дней или менее.

[0037] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[0038] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

[0039] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$.

[0040] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) - (e) проводят в одном контейнере, при этом проведение этапов (b) - (e) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль в сравнении с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

[0041] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

[0042] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенным по меньшей мере в пять раз, или более, продуцированием интерферона-гамма при введении субъекту.

[0043] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[0044] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (f) или (g) вводят инфузией пациенту.

[0045] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

[0046] Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака, включающему введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы;

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования; и

(i) введение терапевтически эффективной дозы третьей популяции ОИЛ из инфузионного мешка на этапе (g) пациенту.

[0047] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (f), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

[0048] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$.

[0049] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

[0050] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

[0051] В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

[0052] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение пяти дней.

[0053] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения пациента с применением режима введения высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения клеток ОИЛ пациенту на этапе (h).

[0054] В некоторых вариантах осуществления режим введения высоких доз IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

[0055] В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), рака почки и почечноклеточного рака.

[0056] В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки и НМРЛ.

[0057] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому.

[0058] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой ПКГШ.

[0059] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки.

[0060] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой НМРЛ.

[0061] Настоящее изобретение также относится к способам размножения опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающим:

(a) добавление измельченных опухолевых фрагментов, полученных из опухоли, резецированной у пациента, в закрытую систему, с получением первой популяции ОИЛ;

(b) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере,

имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (а) к этапу (b) происходит без открывания системы;

(с) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (b) к этапу (с) происходит без открывания системы;

(d) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (с), при этом переход от этапа (с) к этапу (d) происходит без открывания системы; и

(е) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (d) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (d) в (е) происходит без открывания системы.

[0062] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

[0063] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$.

[0064] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования.

[0065] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

[0066] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[0067] В некоторых вариантах осуществления МКПК являются облученными и аллогенными.

[0068] Способ по п. 68, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (с).

[0069] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[0070] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[0071] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем

примерно 27 мм³.

[0072] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 мм³ до примерно 1500 мм³.

[0073] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм³.

[0074] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

[0075] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

[0076] В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[0077] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой НуроThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[0078] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0079] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 11 дней.

[0080] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

[0081] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

[0082] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

[0083] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение 22 дней или менее.

[0084] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[0085] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) - (e) проводят в одном контейнере, при этом проведение этапов (b) - (e) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль в сравнении с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

[0086] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

[0087] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[0088] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

[0089] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор.

[0090] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 10.

[0091] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 100.

[0092] В некоторых вариантах осуществления на этапе (d) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

[0093] В некоторых вариантах осуществления культура клеток имеет соотношение, составляющее $2,5 \times 10^9$ АПК к 100×10^6 ОИЛ.

[0094] В некоторых вариантах осуществления на этапе (c) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

[0095] В некоторых вариантах осуществления культура клеток имеет соотношение, составляющее $2,5 \times 10^9$ АПК to 100×10^6 ОИЛ.

[0096] Настоящее изобретение также относится к популяции размноженных ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, при этом популяция размноженных ОИЛ представляет собой третью популяцию ОИЛ, получаемую способом, включающим:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными

факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы; и

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

[0097] В некоторых вариантах осуществления популяция ОИЛ предназначена для лечения субъекта, страдающего от рака, способами, описанными выше в настоящем документе, при этом способ дополнительно включает один или более признаков, описанных выше в настоящем документе.

[0098] Настоящее изобретение также относится к способам анализа для определения жизнеспособности ОИЛ. Настоящее изобретение относится к способам анализа жизнеспособности ОИЛ путем размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в большую популяцию ОИЛ, включающим:

(i) получение первой популяции ОИЛ, которая была ранее размножена;

(ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, с получением второй популяции ОИЛ; и

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, и при этом третью популяцию ОИЛ дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[0099] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает:

(iv) проведение дополнительного второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, дополнительного ОКТ-3 и дополнительных АПК, при этом дополнительное второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения большей популяции ОИЛ, чем популяция, полученная на этапе (iii), и при этом третью популяцию ОИЛ дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[00100] В некоторых вариантах осуществления перед этапом (i) клетки криоконсервируют.

[00101] В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают перед

проведением этапа (i).

[00102] В некоторых вариантах осуществления этап (iv) повторяют от одного до четырех раз с целью получения достаточного количества ОИЛ для анализа.

[00103] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 40 дней до примерно 50 дней.

[00104] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 48 дней.

[00105] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 45 дней.

[00106] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение примерно 44 дней.

[00107] В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные на этапах (iii) или (iv), экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных уровням свежесобранных клеток.

[00108] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[00109] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-17 на этапе (iii).

[00110] В некоторых вариантах осуществления АПК представляют собой искусственные АПК (иАПК).

[00111] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00112] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00113] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела, слитый с по меньшей мере одним эндодоменом Т-клеточной сигнальной молекулы.

[00114] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00115] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность.

[00116] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования.

[00117] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования и после этапа (iv).

[00118] Настоящее изобретение также относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ,

включающему воздействию на ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, для получения терапевтической популяции ОИЛ, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

[00119] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к индукции экспрессии белков.

[00120] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшению экспрессии белков.

[00121] В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК используют для временного уменьшения экспрессии белков.

[00122] Настоящее изобретение также относится к способу оценки транскрипционных факторов (ТФ) и/или других молекул, способных временно изменять экспрессию белков, включающему размножение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, воздействие на ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, для получения терапевтической популяции ОИЛ, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

[00123] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и цАМФ-зависимой протеинкиназы А (РКА).

[00124] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды,

0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(e) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (e) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (e) к этапу (h) происходят без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[00125] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции

ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(e) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[00126] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых

фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f) с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLV, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[00127] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f) с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLV, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (e) к этапу (h) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом

перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[00128] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют к первой популяции клеток два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней в течение первого периода размножения.

[00129] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют ко второй популяции клеток два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней в течение первого периода размножения.

[00130] В некоторых вариантах осуществления две сд-РНК добавляют для ингибирования экспрессии двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB.

[00131] В некоторых вариантах осуществления две сд-РНК добавляют для ингибирования экспрессии двух молекул, при этом две молекулы выбирают из групп, состоящих из:

- i. PD-1 и LAG-3,
- ii. PD-1 и TIM-3,
- iii. PD-1 и CISH,
- iv. PD-1 и CBLB,
- v. LAG-3 и TIM-3,
- vi. LAG-3 и CISH,
- vii. LAG-3 и CBLB,
- viii. TIM-3 и CISH,
- ix. TIM-3 и CBLB, и
- x. CISH и CBLB.

[00132] В некоторых вариантах осуществления добавляют более двух сд-РНК для ингибирования экспрессии более чем двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB.

[00133] В некоторых вариантах осуществления экспрессия по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, уменьшается на по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% в ОИЛ, контактировавших с по меньшей мере одной сд-РНК.

[00134] В некоторых вариантах осуществления экспрессия по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, уменьшается на по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% на по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часа или по меньшей мере 48 часов в ОИЛ, контактировавших с по меньшей мере одной сд-РНК.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00135] **Фигура 1:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа 2А, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00136] **Фигура 2:** Показано сравнение между способом 1С и вариантом осуществления способа 2А для производства ОИЛ.

[00137] **Фигура 3:** Представлен план-график способа 1С.

[00138] **Фигура 4:** Показан способ по варианту осуществления ОИЛ-терапии с использованием способа 2А для производства ОИЛ, включающий этапы введения и совместной терапии, для более высокого количества клеток.

[00139] **Фигура 5:** Показан способ по варианту осуществления ОИЛ-терапии с использованием способа 2А для производства ОИЛ, включающий этапы введения и совместной терапии, для более низкого количества клеток.

[00140] **Фигура 6:** Представлена подробная схема для варианта осуществления способа 2А.

[00141] **Фигура 7А - Фигура 7С:** Показаны основные этапы варианта осуществления способа 2А, включая этапы криоконсервирования.

[00142] **Фигура 8:** Иллюстративная схема технологического процесса способа 2А с описанием этапов А-Ф.

[00143] **Фигура 9:** Схема технологического процесса для плана сбора данных в способе 2А.

[00144] **Фигура 10:** Схема иллюстративного варианта осуществления протокола быстрого размножения (ПБР). После доставки опухоль фрагментируют и помещают во флаконы G-Rex с IL-2 для размножения ОИЛ (пре-ПБР размножение) на 11 дней. Для изучения тройного коктейля добавляют смесь IL-2/IL-15/IL-21 в момент начала пре-ПБР. Для протокола быстрого размножения (ПБР) ОИЛ культивируют с питающими клетками и ОКТ3 для размножения в ПБР в течение дополнительных 11 дней.

[00145] **Фигура 11:** Иллюстративный процесс производства криоконсервированных ОИЛ (~22 дня).

[00146] **Фигура 12:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа 2А, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00147] **Фигура 13:** Сравнение таблицы этапов А-Ф из иллюстративных вариантов осуществления способа 1С и способа 2А.

[00148] **Фигура 14:** Подробное сравнение варианта осуществления способа 1С и варианта осуществления способа 2А.

[00149] **Фигура 15:** Схема варианта осуществления процесса производства криоконсервированных ОИЛ (22 дня).

[00150] **Фигура 16:** Таблица усовершенствований способа от Gen 1 до Gen 2.

[00151] **Фигура 17:** Схема способа Gen 2 производства криоконсервированных LN-144.

[00152] **Фигура 18:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа 2А, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00153] **Фигура 19:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) упаковки для переноса суспензии ОИЛ с нижней частью (одна линия) гравитационного фильтра для крови.

[00154] **Фигура 20:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) красной линии для удаления среды из G-Rex MCS с пакетом для переноса «супернатант».

[00155] **Фигура 21:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) 4S-4M60 с Cell Connect CC2, заменяющего одну иглу прибора Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G).

[00156] **Фигура 22:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) набора для переливания плазмы с одним из конусов Люэра в 4S-4M60.

[00157] **Фигура 23:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) длинного конца гравитационного фильтра для крови с исходным мешком LOVO.

[00158] **Фигура 24:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) одной из двух исходных линий фильтра с собирающим мешком «объединенная суспензия ОИЛ».

[00159] **Фигура 25:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) 4S-4M60 с Cell Connect CC2, заменяющего одну иглу прибора Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G).

[00160] **Фигура 26:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) криомешков CS750 с конструкцией, созданной на этапе 8.14.8, заменяющего каждый из четырех конусов Люэра (E) на каждый мешок.

[00161] **Фигура 27:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) мешков CS-10 с иглами 4S-4M60.

[00162] **Фигура 28:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) мешка «сформулированные ОИЛ» с оставшейся иглой (A) на устройстве, созданном на этапе 8.14.10.

[00163] **Фигура 29:** Показана схема термосварки (смотри, примечание 5.11 к способу в Примере 16) в F, приводящей к удалению пустого мешка ретентата и мешков CS-10.

[00164] **Фигура 30:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа получения ОИЛ для временного редактирования генов.

[00165] **Фигура 31:** Представлены диаграммы вариантов осуществления способов получения ОИЛ для временного редактирования генов.

[00166] **Фигура 32:** Показано схематически включение этапа переноса РНК в

способ получения ОИЛ для целей временного перепрограммирования генов.

[00167] **Фигура 33:** Представлен обзор предлагаемых генно-инженерных подходов для временных изменений экспрессии генов в ОИЛ.

[00168] **Фигура 34:** Представлен обзор хемокинов и хемокиновых рецепторов, для которых может быть использовано временное изменение экспрессии генов с целью улучшения направленной миграции ОИЛ к зоне опухоли.

[00169] **Фигура 35:** Представлен второй обзор хемокинов и хемокиновых рецепторов, для которых может быть использовано временное изменение экспрессии генов с целью улучшения направленной миграции ОИЛ к зоне опухоли.

[00170] **Фигура 36:** Представлено схематическое структурное изображение иллюстративного варианта осуществления самодоставляемой рибонуклеиновой кислоты (сд-РНК). Смотри Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, **2018**.

[00171] **Фигура 37:** Представлено схематическое структурное изображение иллюстративного варианта осуществления сд-РНК. Смотри публикацию патента США № 2016/0304873.

[00172] **Фигура 38:** Показана иллюстративная схема синтеза мРНК с ДНК-матрицы, полученной методом ПЦР с использованием специально разработанных праймеров. Прямой праймер содержит промотор бактериофага, подходящий для *in vitro* транскрипции, и обратный праймер содержит участок поли-Т. ПЦР-продукт представляет собой экспрессионную кассету, подходящую для *in vitro* транскрипции. Полиаденилаты на 3'-конце образующейся мРНК могут предотвращать aberrantный повторный синтез РНК и образование двухцепочечного РНК-продукта. После завершения транскрипции поли-А «хвост» может дополнительно удлиняться за счет поли(А)-полимеразы (смотри патент США № 8859229.)

[00173] **Фигура 39:** Таблица, показывающая опосредованное sd-rxRNA[®] выключение генов PDCD1, TIM3, CBLB, LAG3 и CISH.

[00174] **Фигура 40:** Опосредованное sd-rxRNA[®] выключение генов в ОИЛ; иллюстративный протокол. Иллюстративные опухоли включают меланому (свежую или замороженную; n=6), опухоль молочной железы (свежую или замороженную; n=5), опухоль легкого (n=1), саркому (n=1) и/или рак яичника (n=1).

[00175] **Фигура 41:** Уменьшение экспрессии белков было обнаружено в 4 из 5 мишеней. PD1: n=9, TIM3: n=8, LAG3/CISH: n=2, Cbl-b n=2. Препараты пре-ПБР из меланомы и свежие ОИЛ из рака молочной железы, 2 мкМ sd-rxRNA[®]. % KD рассчитывали по формуле $(100 - (100 * (\text{интересующий ген}/\text{НЦК})))$.

[00176] **Фигура 42:** Уменьшение индуцированного sd-rxRNA[®] KD с течением времени и после стимуляции. n=3, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®].

[00177] **Фигура 43:** На жизнеспособность ОИЛ слегка повлияла PDCD1 sd-rxRNA[®]. PD1, TIM3 n>6, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы/свежего рака молочной железы. LAG3, CISH n=2, пре-ПБР ОИЛ из меланомы и рака молочной железы, 2 мкМ sd-

rxRNA[®].

[00178] **Фигура 44:** Опосредованный sd-rxRNA[®] KD PD1 и TIM3 был связан с фенотипическими изменениями, характерными для активации ОИЛ. n=3, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®].

[00179] **Фигура 45А и Фигура 45В:** Нокдаун PD1 и TIM3 за счет sd-rxRNA[®] не влияет на экспрессию других маркеров ингибирования/истощения. **А)** и **В)** n=3, TIM3: n=2, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®].

[00180] **Фигура 46:** PD1 и TIM3 KD не приводил к значительному улучшению секреции IFN γ . n=3, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®].

[00181] **Фигура 47А - Фигура 47F:** Мобилизация CD107a не была затронута ни одной из sd-rxRNA[®]. **А)** n=6, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®]. **В)** n=2, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы и ОИЛ из рака молочной железы, 2 мкМ sd-rxRNA[®]. **С)** n=3, ОИЛ из замороженной меланомы и свежего рака молочной железы. **Д)** n=3, ОИЛ из замороженной меланомы, свежего рака молочной железы и рака легкого. **Е)** и **F)** n=3, свежие препараты из раковых опухолей молочной железы.

[00182] **Фигура 48:** xCELLigence анализ клеток в реальном времени (RTCA).

[00183] **Фигура 49А и Фигура 49В:** PD1 KD ОИЛ отличались большей эффективностью уничтожения клеток. **А)** Репрезентативный график эффективности уничтожения. **В)** Репрезентативный график для n=3, ОИЛ из меланомы, 2 мкМ sd-rxRNA[®].

[00184] **Фигура 50А и Фигура 50В:** Эксперименты по изучению ответа на дозу sd-rxRNA[®]. **А)** n=3, свежие препараты из раковых опухолей молочной железы. **В)** n=3, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы.

[00185] **Фигура 51:** Опосредованный sd-rxRNA[®] нокдаун CBLB не был обнаружен. **А)** график. **В)** Графики, полученные в анализе проточной цитометрии. n=2, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы и ОИЛ из свежего рака молочной железы. Отсутствовали изменения в уровнях мРНК CBLB в сравнении с НЦК. Отсутствовало изменение уровня белка Cbl-b в анализе проточной цитометрии.

[00186] **Фигура 52А и Фигура 52В:** Показано тестирование опосредованного sd-rxRNA[®] выключения генов в процессе производства ОИЛ от компании Iovance, оценка фенотипа ОИЛ. Опосредованный sd-rxRNA[®] нокдаун PD-1 был связан с фенотипическими изменениями, характерными для активации ОИЛ. PD-1, n>6, препараты пре-ПБР ОИЛ из меланомы/свежего рака молочной железы, 2 мкМ sd-rxRNA[®]. **А)** CD25, CCR7, CD27, CD28, CD56, CD95, 4-1BB и OX40. **В)** CD25, CD56, CCR7, 4-1BB и OX40. N=12, свежие и замороженные ОИЛ; молочная железа, меланома, яичник и легкое.

[00187] **Фигура 53А и Фигура 53В:** Добавление PD1 sd-rxRNA[®] приводило к значительному уменьшению роста клеток, но не жизнеспособности ОИЛ. **А)** Кратность увеличения количества. **В)** Жизнеспособность клеток. n=7, ОИЛ из рака молочной железы, саркомы и рака легкого.

[00188] **Фигура 54А и Фигура 54В:** PD1 KD не приводит к улучшению

мобилизации CD107a и секреции IFN γ в ответ на неспецифическую стимуляцию. А) Процентная доля CD8 клеток, экспрессирующих CD107a, до и после стимуляции. В) Секреция IFN γ до и после стимуляции. n=6, ОИЛ из меланомы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00189] SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи муромонаба.

[00190] SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи муромонаба.

[00191] SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-2.

[00192] SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

[00193] SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-4.

[00194] SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-7.

[00195] SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-15.

[00196] SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-21.

[00197] SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого 4-1BB.

[00198] SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность мышинового 4-1BB.

[00199] SEQ ID NO: 11 представляет собой тяжелую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00200] SEQ ID NO: 12 представляет собой легкую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00201] SEQ ID NO: 13 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00202] SEQ ID NO: 14 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00203] SEQ ID NO: 15 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00204] SEQ ID NO: 16 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00205] SEQ ID NO: 17 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00206] SEQ ID NO: 18 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00207] SEQ ID NO: 19 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00208] SEQ ID NO: 20 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00209] SEQ ID NO: 21 представляет собой тяжелую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00210] SEQ ID NO: 22 представляет собой легкую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00211] SEQ ID NO: 23 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00212] SEQ ID NO: 24 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00213] SEQ ID NO: 25 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00214] SEQ ID NO: 26 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00215] SEQ ID NO: 27 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00216] SEQ ID NO: 28 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00217] SEQ ID NO: 29 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00218] SEQ ID NO: 30 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00219] SEQ ID NO: 31 представляет собой Fc-домен слитого белка - агониста TNFRSF.

[00220] SEQ ID NO: 32 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00221] SEQ ID NO: 33 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00222] SEQ ID NO: 34 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00223] SEQ ID NO: 35 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00224] SEQ ID NO: 36 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00225] SEQ ID NO: 37 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00226] SEQ ID NO: 38 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00227] SEQ ID NO: 39 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00228] SEQ ID NO: 40 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00229] SEQ ID NO: 41 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00230] SEQ ID NO: 42 представляет собой Fc-домен слитого белка - агониста TNFRSF.

[00231] SEQ ID NO: 43 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00232] SEQ ID NO: 44 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00233] SEQ ID NO: 45 представляет собой линкер слитого белка - агониста TNFRSF.

[00234] SEQ ID NO: 46 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда 4-1BB (4-1BBL).

[00235] SEQ ID NO: 47 представляет собой растворимый фрагмент полипептида 4-1BBL.

[00236] SEQ ID NO: 48 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 1.

[00237] SEQ ID NO: 49 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 1.

[00238] SEQ ID NO: 50 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 2.

[00239] SEQ ID NO: 51 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 2.

[00240] SEQ ID NO: 52 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела H39E3-2.

[00241] SEQ ID NO: 53 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела H39E3-2.

[00242] SEQ ID NO: 54 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого OX40.

[00243] SEQ ID NO: 55 представляет собой аминокислотную последовательность мышинового OX40.

[00244] SEQ ID NO: 56 представляет собой тяжелую цепь агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00245] SEQ ID NO: 57 представляет собой легкую цепь агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00246] SEQ ID NO: 58 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00247] SEQ ID NO: 59 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00248] SEQ ID NO: 60 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00249] SEQ ID NO: 61 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00250] SEQ ID NO: 62 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00251] SEQ ID NO: 63 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00252] SEQ ID NO: 64 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00253] SEQ ID NO: 65 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00254] SEQ ID NO: 66 представляет собой тяжелую цепь агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00255] SEQ ID NO: 67 представляет собой легкую цепь агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00256] SEQ ID NO: 68 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00257] SEQ ID NO: 69 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00258] SEQ ID NO: 70 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00259] SEQ ID NO: 71 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00260] SEQ ID NO: 72 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00261] SEQ ID NO: 73 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00262] SEQ ID NO: 74 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00263] SEQ ID NO: 75 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 11D4.

[00264] SEQ ID NO: 76 представляет собой тяжелую цепь агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00265] SEQ ID NO: 77 представляет собой легкую цепь агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00266] SEQ ID NO: 78 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00267] SEQ ID NO: 79 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00268] SEQ ID NO: 80 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00269] SEQ ID NO: 81 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00270] SEQ ID NO: 82 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00271] SEQ ID NO: 83 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00272] SEQ ID NO: 84 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00273] SEQ ID NO: 85 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела 18D8.

[00274] SEQ ID NO: 86 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00275] SEQ ID NO: 87 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00276] SEQ ID NO: 88 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00277] SEQ ID NO: 89 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00278] SEQ ID NO: 90 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00279] SEQ ID NO: 91 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00280] SEQ ID NO: 92 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00281] SEQ ID NO: 93 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu119-122.

[00282] SEQ ID NO: 94 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00283] SEQ ID NO: 95 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00284] SEQ ID NO: 96 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00285] SEQ ID NO: 97 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00286] SEQ ID NO: 98 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00287] SEQ ID NO: 99 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00288] SEQ ID NO: 100 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00289] SEQ ID NO: 101 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста OX40, моноклонального антитела Hu106-222.

[00290] SEQ ID NO: 102 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда OX40 (OX40L).

[00291] SEQ ID NO: 103 представляет собой растворимый фрагмент полипептида OX40L.

[00292] SEQ ID NO: 104 представляет собой альтернативный растворимый фрагмент полипептида OX40L.

[00293] SEQ ID NO: 105 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 008.

[00294] SEQ ID NO: 106 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 008.

[00295] SEQ ID NO: 107 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 011.

[00296] SEQ ID NO: 108 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 011.

[00297] SEQ ID NO: 109 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 021.

[00298] SEQ ID NO: 110 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 021.

[00299] SEQ ID NO: 111 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела 023.

[00300] SEQ ID NO: 112 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела 023.

[00301] SEQ ID NO: 113 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела.

[00302] SEQ ID NO: 114 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела.

[00303] SEQ ID NO: 115 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела.

[00304] SEQ ID NO: 116 представляет собой переменную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела.

[00305] SEQ ID NO: 117 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, гуманизованного моноклонального антитела.

[00306] SEQ ID NO: 118 представляет собой переменную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, гуманизованного моноклонального антитела.

[00307] SEQ ID NO: 119 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00308] SEQ ID NO: 120 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00309] SEQ ID NO: 121 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00310] SEQ ID NO: 122 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00311] SEQ ID NO: 123 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00312] SEQ ID NO: 124 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, гуманизированного моноклонального антитела.

[00313] SEQ ID NO: 125 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста OX40, моноклонального антитела.

[00314] SEQ ID NO: 126 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста OX40, моноклонального антитела.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Введение

[00315] Адоптивная клеточная терапия с использованием ОИЛ, культивируемых *ex vivo* в соответствии с протоколом быстрого размножения (ПБР), явилась успешной адоптивной клеточной терапией после иммуносупрессии у пациентов с меланомой. Современные параметры приемлемости инфузии опираются на показатели состава ОИЛ (например, наличие маркеров CD28, CD8 или CD4), а также на кратность увеличения количества и жизнеспособность препарата ПБР.

[00316] Современные протоколы ПБР дают слабое представление о степени здорового состояния ОИЛ, которые будут введены инфузией пациенту. Т-клетки претерпевают глубокий метаболический сдвиг в процессе их созревания от необученных до эффекторных Т-клеток (смотри публикацию Chang, et al., Nat. Immunol. **2016**, 17, 364, специально включенную в настоящий документ в полном объеме, и в частности, обсуждение и маркеры анаэробного и аэробного метаболизма). Например, необученные Т-клетки зависят от митохондриального дыхания для продуцирования АТФ, в то время как зрелые здоровые эффекторные Т-клетки, такие как ОИЛ, являются в высокой степени гликолитическими, находясь в зависимости от аэробного гликолиза для обеспечения биоэнергетических субстратов, необходимых им для пролиферации, миграции, активации и противоопухолевой активности.

[00317] Современные способы производства ОИЛ имеют ограничения в отношении продолжительности, стоимости, проблем со стерильностью, а также других факторов, описанных в настоящем документе, так что такие способы имеют очень ограниченный потенциал для коммерциализации, и вследствие этого, а также других причин, в настоящее время такой коммерческий способ отсутствует. Настоящее изобретение

относится к способам производства ОИЛ, в которых используют методологию временного изменения экспрессии белков, и к методам лечения, основанным на таких способах, которые подходят для промышленного масштаба производства и нормативного утверждения с целью использования для пациентов-людей во многих клинических центрах. Настоящее изобретение относится к способам временной генетической модификации для перепрограммирования ОИЛ с целью получения терапевтических популяций ОИЛ с повышенной терапевтической эффективностью.

[00318]

II. Определения

[00319] Если нет иных указаний, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. Полное содержание всех патентов и публикаций, упомянутых в настоящем документе, включено посредством ссылки.

[00320] Термин «*in vivo*» относится к событию, которое имеет место в организме субъекта.

[00321] Термин «*in vitro*» относится к событию, которое имеет место за пределами организма субъекта. *In vitro* анализы включают клеточные анализы, в которых используют живые или мертвые клетки, и также могут включать бесклеточные анализы, в которых не используют какие-либо интактные клетки.

[00322] Термин «*ex vivo*» относится к событию, которое включает обработку, или выполнение процедуры для, клетки, ткани и/или органа, которые были удалены из организма субъекта. Соответственно, клетка, ткань и/или орган могут быть возвращены в организм субъекта при хирургической операции или лечении.

[00323] Термин «быстрое размножение» означает увеличение количества антиген-специфических ОИЛ по меньшей мере примерно в 3 раза (или 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) в течение недели, более предпочтительно по меньшей мере примерно в 10 раз (или 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) в течение недели, или наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно в 100 раз в течение недели. Несколько протоколов быстрого размножения описаны ниже.

[00324] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты», или «ОИЛ», означает популяцию клеток, исходно полученную в виде белых клеток крови, которые покидают кровотока в организме субъекта и мигрируют в опухоль. ОИЛ включают, но без ограничения, 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 описано в настоящем документе (в настоящем документе их иногда называют «свежесобранные»), и «вторичные ОИЛ» представляют собой любые клеточные популяции ОИЛ, которые размножились или пролиферировали, как описано в настоящем

документе, включая, но без ограничения, суммарные ОИЛ и размноженные ОИЛ («ПБР ОИЛ» или «пост-ПБР ОИЛ»). Клеточные популяции ОИЛ могут включать генетически модифицированные ОИЛ.

[00325] Используемый в настоящем документе термин «популяция клеток» (включая ОИЛ) означает некоторое число клеток, обладающих общими признаками. В целом, популяции обычно содержат количество клеток в диапазоне от 1×10^6 до 1×10^{10} , при этом разные популяции ОИЛ содержат разные количества клеток. Например, начальный рост первичных ОИЛ в присутствии ИЛ-2 приводит к получению популяции суммарных ОИЛ, насчитывающей примерно 1×10^8 клеток. Размножение в фазе ПБР, как правило, заканчивается при получении популяций, содержащих от $1,5 \times 10^9$ до $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

[00326] Используемый в настоящем документе термин «криоконсервированные ОИЛ» означает, что ОИЛ, либо первичные, суммарные, либо размноженные (ПБР ОИЛ), обрабатывают и хранят в диапазоне температур примерно от -150°C до -60°C . Общие методы криоконсервирования также описаны в других разделах настоящего документа, включая примеры. Для ясности, «криоконсервированные ОИЛ» отличаются от замороженных образцов ткани, которые могут быть использованы в качестве источника первичных ОИЛ.

[00327] Используемый в настоящем документе термин «размороженные криоконсервированные ОИЛ» означает популяцию ОИЛ, которая ранее была криоконсервирована, а затем ее температура была повышена до комнатной температуры или выше, включая, но без ограничения, температуру культивирования клеток, или температуру, при которой ОИЛ могут быть введены пациенту.

[00328] В целом, ОИЛ можно характеризовать либо биохимически, по клеточным поверхностным маркерам, либо функционально, по их способности к инфильтрации опухолей и эффективному лечению. ОИЛ, как правило, можно относить к определенной категории на основании экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно, и альтернативно, ОИЛ могут быть функционально охарактеризованы по их способности к инфильтрации солидных опухолей после повторного введения в организм пациента.

[00329] Термин «среды для криоконсервирования», или «среда для криоконсервирования», относится к любой среде, которая может быть использована для криоконсервирования клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие от 7% до 10% ДМСО. Иллюстративные среды включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их сочетание. Термин «CS10» означает среду для криоконсервирования, которую получают от компании Stemcell Technologies или от компании Biolife Solutions. Среда CS10 можно называть торговым названием «CryoStor[®] CS10». Среда CS10 представляет собой бессывороточную, не содержащую животные компоненты среду, которая содержит ДМСО.

[00330] Термин «центральные Т-клетки памяти» означает подмножество Т-клеток,

которые у человека представляют собой CD45R0+ клетки и конститутивно экспрессируют CCR7 (CCR7^{hi}) и CD62L (CD62^{hi}). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для центральных Т-клеток памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMI1. Центральные Т-клетки памяти в основном секреторируют IL-2 и CD40L в качестве эффекторных молекул после стимуляции TCR. Центральные Т-клетки памяти преобладают в группе CD4 клеток в крови, и у человека они пропорционально обогащены в лимфатических узлах и миндалинах.

[00331] Термин «эффекторные Т-клетки памяти» означает подмножество Т-клеток человека или млекопитающих, которые подобно центральным Т-клеткам памяти, представляют собой CD45R0+ клетки, однако утратили конститутивную экспрессию CCR7 (CCR7^{lo}) и имеют гетерогенную или низкую экспрессию CD62L (CD62L^{lo}). Поверхностный фенотип центральных Т-клеток памяти также включает TCR, CD3, CD127 (IL-7R) и IL-15R. Факторы транскрипции для центральных Т-клеток памяти включают BLIMP1. Эффекторные Т-клетки памяти быстро секреторируют на высоких уровнях воспалительные цитокины после антигенной стимуляции, в том числе интерферон- γ , IL-4 и IL-5. Эффекторные Т-клетки памяти преобладают в группе CD8 клеток в крови, и у человека они пропорционально обогащены в легких, печени и пищеварительном тракте. CD8+ эффекторные Т-клетки памяти содержат большие количества перфорина.

[00332] Термин «закрытая система» означает систему, которая закрыта для внешнего окружения. Любую закрытую систему, подходящую для способов культивирования клеток, можно использовать со способами по настоящему изобретению. Закрытые системы включают, но не ограничиваются ими, например, закрытые G-контейнеры. После того, как сегмент опухоли добавляют в закрытую систему, систему не открывают для внешнего окружения до тех пор, пока ОИЛ не будут готовы для введения пациенту.

[00333] Используемые в настоящем документе термины «фрагментирование», «фрагмент» и «фрагментированные» описывают методы разрушения опухоли, включая механические методы фрагментирования, такие как дробление, разрезание, разделение и разрушение опухолевой ткани, а также любой другой метод разрушения физической структуры опухолевой ткани.

[00334] Термины «моноклеарные клетки периферической крови» и «МКПК» означают клетки периферической крови, имеющие круглое ядро, включая лимфоциты (такие как Т-клетки, В-клетки и НК клетки) и моноциты. Предпочтительно, моноклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеарные клетки периферической крови. МКПК представляют собой разновидность антигенпредставляющих клеток.

[00335] Термин «анти-CD3 антитело» означает антитело, или его вариант, например, моноклональное антитело, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышьиные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-

клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Анти-CD3 антитела включают ОКТ-3, также известное как муромонаб. Анти-CD3 антитела также включают клон УНСТ1, также известный как Т3 и CD3ε. Другие анти-CD3 антитела включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и висилизумаб.

[00336] Термин «ОКТ-3» (другое название в настоящем документе «ОКТ3») относится к моноклональному антителу, или его биологическому аналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которое направлено против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и охватывает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) и муромонаб, или их варианты с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы или биоэквиваленты. 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, депонирована в Американской коллекции типовых культур и имеет регистрационный номер ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать ОКТ-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) и имеет каталожный № 86022706.

ТАБЛИЦА 1. Аминокислотные последовательности муромонаба.

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 1 Муромонаб, тяжелая цепь	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDS DGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 2 Муромонаб, легкая цепь	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTC SASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAN 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG

TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00337] Термин «IL-2» (другое название в настоящем документе «IL2») означает Т-клеточный фактор роста, известный как интерлейкин-2, и охватывает все формы IL-2, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биоэквиваленты и варианты. IL-2 описан, например, в публикациях Nelson, J. Immunol. **2004**, 172, 3983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. **2008**, 26, 453-79, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-2, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 3). Например, термин IL-2 охватывает человеческие, рекомбинантные формы IL-2, такие как альдеслейкин (пролейкин, коммерчески доступный от многих поставщиков в дозе 22 миллиона МЕ во флаконах одноразового использования), а также форма рекомбинантного IL-2, коммерчески доступная от CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-209-b), и другие коммерческие эквиваленты от других поставщиков. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) представляет собой не гликозилированную форму человеческого рекомбинантного IL-2 с молекулярной массой примерно 15 кДа. Аминокислотная последовательность альдеслейкина, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 4). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, описанные в настоящем документе, включая пегилированный IL2 в виде пролекарства NKTR-214, доступный от Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214 и пегилированный IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0328791 A1 и публикации международной патентной заявки № WO 2012/065086 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Альтернативные формы конъюгированного IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Препараты IL-2, подходящие для использования по изобретению, описаны в патенте США № 6706289, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

ТАБЛИЦА 2. Аминокислотные последовательности интерлейкинов

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 3 рекомбинантный человеческий IL-	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKGYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS

2 (rhIL-2)	ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO: 4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITΦQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 5 рекомбинантный человеческий IL- 4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 6 рекомбинантный человеческий IL- 7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSTMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTOIJI LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO: 7 рекомбинантный человеческий IL- 15 (rhIL-15)	MNWWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO: 8 рекомбинантный человеческий IL- 21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

[00338] Термин «IL-4» (другое название в настоящем документе «IL4») означает цитокин, известный как интерлейкин 4, который продуцируется Th2 Т-клетками, а также эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференциацию необученных хелперных Т-клеток (Th0 клеток) в Th2 Т-клетки. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001**, 2, 66-70. При активации IL-4 Th2 Т-клетки затем дополнительно продуцируют IL-4 по механизму положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию МНС класса II, а также индуцирует переключение класса на IgE и экспрессию IgG1 В-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-4, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен от многих

поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-4, каталожный № Gibco CTR0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 5).

[00339] Термин «IL-7» (другое название в настоящем документе «IL7») означает гликозилированный, происходящий из тканей цитокин, известный как интерлейкин-7, который может быть получен из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, Blood **2002**, 99, 3892-904. IL-7 может стимулировать развитие Т-клеток. IL-7 связывается с рецептором IL-7, гетеродимером, состоящим из альфа-цепи рецептора IL-7 и общей гамма-цепи рецептора, которые участвуют в передаче серии сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий IL-7, подходящий для использования по изобретению, коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-7, каталожный № Gibco RHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 6).

[00340] Термин «IL-15» (другое название в настоящем документе «IL15») означает Т-клеточный фактор роста, известный как интерлейкин-15, и охватывает все формы IL-15, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биоэквиваленты и варианты. IL-15 описан, например, в публикации Fehniger and Caligiuri, Blood **2001**, 97, 14-32, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-15 имеет β и γ сигнальные рецепторные субъединицы, общие с IL-2. Рекомбинантный человеческий IL-15 представляет собой одиночную, не гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой остаток метионина) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-15 коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-15, каталожный № 34-8159-82). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-15, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 7).

[00341] Термин «IL-21» (другое название в настоящем документе «IL21») означает белок плеiotропного цитокина, известный как интерлейкин-21, и охватывает все формы IL-21, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биоэквиваленты и варианты. IL-21 описан, например, в публикации Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. **2014**, 13, 379-95, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. IL-21 в основном продуцируется Т-клетками - естественными киллерами и активированными

человеческими CD4⁺ Т-клетками. Рекомбинантный человеческий IL-21 представляет собой одиночную, не гликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты, с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий IL-21 коммерчески доступен от многих поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (каталожный № CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок человеческого IL-21, каталожный № 14-8219-80). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-21, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 8).

[00342] Когда указано «противоопухолевое эффективное количество», «опухоль-ингибирующее эффективное количество» или «терапевтическое количество», точное количество композиции по настоящему изобретению для введения может определять врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела размерах опухоли, степени инфекции или метастазирования, а также состояния здоровья пациента (субъекта). В целом, можно утверждать, что фармацевтическую композицию, содержащую опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (например, вторичные ОИЛ или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанную в настоящем документе, можно вводить в дозе 10^4 - 10^{11} клеток/кг массы тела (например, 10^5 - 10^6 , 10^5 - 10^{10} , 10^5 - 10^{11} , 10^6 - 10^{10} , 10^6 - 10^{11} , 10^7 - 10^{11} , 10^7 - 10^{10} , 10^8 - 10^{11} , 10^8 - 10^{10} , 10^9 - 10^{11} или 10^9 - 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целые значения в пределах этих диапазонов. Композиции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (включая, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) также можно вводить в этих дозах множество раз. Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (включая, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) можно вводить методом инфузии, часто используемым при иммунотерапии (смотри, например, Rosenberg et al., N. Eng. J. Med. 319: 1676, 1988). Оптимальную дозу и режим лечения для конкретного пациента может с легкостью определять специалист в области медицины, контролируя у пациента признаки заболевания и соответствующим образом корректируя лечение.

[00343] Термин «гематологическое злокачественное новообразование» относится к формам рака и опухолям гемопоэтических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но без ограничения, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также называют «жидкими опухолями». Гематологические злокачественные новообразования включают, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелколимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМоЛ), лимфому Ходжкина и неходжскинские лимфомы. Термин «В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование» относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, затрагивающим В-клетки.

[00344] Термин «солидная опухоль» означает аномальную массу ткани, которая, как правило, не содержит кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть

доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная злокачественная опухоль» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Злокачественные солидные опухоли включают, но без ограничения, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Структура ткани солидных опухолей включает взаимосвязанные тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, среди которых распределены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую микросреду.

[00345] Термин «жидкая опухоль» означает аномальную массу клеток, которая по своей природе является жидкой. Жидкие злокачественные новообразования включают, но без ограничения, лейкозы, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные новообразования. ОИЛ, полученные из жидких опухолей, в настоящем документе также могут быть названы инфильтрирующими костный мозг лимфоцитами (ИКМЛ).

[00346] Используемый в настоящем документе термин «микросреда» может относиться к микросреде солидной или гематологической опухоли в целом, или к отдельной подгруппе клеток в этой микросреде. Используемый в настоящем документе термин «микросреда опухоли» означает сложную смесь «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических внешних стимулов, способствующих неопластической трансформации, поддерживающих рост и инвазию опухоли, защищающих опухоль от иммунной системы хозяина, стимулирующих терапевтическую резистентность и обеспечивающих ниши для развития основных метастазов», как описано в Swartz, et al., *Cancer Res.*, **2012**, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны узнаваться Т-клетками, уничтожение опухоли за счет иммунной системы является редким событием из-за иммунной супрессии, создаваемой микросредой опухоли.

[00347] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака популяцией ОИЛ, при этом пациент предварительно получал лечение с применением режима немиелоаблативной химиотерапии до инфузии ОИЛ по изобретению. В некоторых вариантах осуществления популяция ОИЛ может быть предоставлена, когда пациент предварительно получал лечение с применением режима немиелоаблативной химиотерапии до инфузии ОИЛ по изобретению. В одном из вариантов осуществления режим немиелоаблативной химиотерапии включает введение циклофосфида в дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение 2 дней (дни 27 и 26 до инфузии ОИЛ) и флударабина в дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение 5 дней (дней 27-23 до инфузии ОИЛ). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ОИЛ (в день 0) по изобретению пациент получает внутривенную инфузию IL-2 в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности.

[00348] Экспериментальные результаты показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в

повышении эффективности лечения за счет элиминации регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемой «иммуносупрессивным кондиционированием») для пациента перед введением рОИЛ по изобретению.

[00349] Используемые в настоящем документе термины «совместное введение», «введение совместно с», «введенные в сочетании с», «введение в сочетании с», «одновременное» и «совместное» означают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, по меньшей мере одного агониста калиевых каналов в сочетании со множеством ОИЛ) субъекту таким образом, что оба активных фармацевтических ингредиента и/или их метаболиты присутствуют в организме субъекта субъекта в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение в отдельных композициях, введение в разные моменты времени в отдельных композициях или введение в композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Одновременное введение в отдельных композициях и введение в композиции, в которой присутствуют оба средства, являются предпочтительными.

[00350] Термин «эффективное количество», или «терапевтически эффективное количество», означает количество соединения или сочетания соединений, описанных в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления запланированного воздействия, включая, но без ограничения, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от запланированного применения (*in vitro* или *in vivo*) или от субъекта и болезненного состояния, которое подвергают лечению (например, массы тела, возраста и пола субъекта), степени тяжести болезненного состояния или способа введения. Термин также применяют к дозе, которая будет индуцировать конкретный ответ в клетках-мишенях (например, уменьшение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретного выбранного соединения, назначенного режима дозирования, от того, вводят ли соединение в сочетании с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую его вводят, а также от физической системы доставки, в которой находится соединение.

[00351] Термины «терапия», «лечение», «лечить», и тому подобные, относятся к достижению желательного фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим, заключающимся в полном или частичном предотвращении заболевания, или его симптома, и/или может быть терапевтическим, заключающимся в частичном или полном излечении от заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Используемый в настоящем документе термин «лечение» охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у

субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не диагностирован, как имеющий его; (b) ингибирование заболевания, то есть, остановку его развития или прогрессирования; и (c) облегчение заболевания, то есть, вызывание регрессии заболевания и/или облегчение одного или более симптомов заболевания. «Лечение» также включает доставку средства для обеспечения фармакологического эффекта, даже в отсутствие заболевания или состояния. Например, «лечение» включает доставку композиции, которая вызывает иммунный ответ или приводит к созданию иммунитета в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцины.

[00352] Термин «гетерологичные» применительно к фрагментам нуклеиновой кислоты или белка указывает на то, что нуклеиновая кислота или белок содержит две или более подпоследовательности, которые в природе не находятся в такой же связи друг с другом. Например, нуклеиновую кислоту, как правило, получают рекомбинантными методами, при этом две или более последовательностей из не связанных генов объединяют, получая новую функциональную нуклеиновую кислоту, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника, или кодирующие области из разных источников. Аналогично, термин «гетерологичный» белок указывает на то, что белок содержит две или более подпоследовательностей, которые в природе не находятся в такой же связи друг с другом (например, слитый белок).

[00353] Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «на 99% идентичны») в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям, или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент нуклеотидов, или аминокислотных остатков, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании (с внесением пробелов, при необходимости) для максимального соответствия, не считая любые консервативные аминокислотные замены в качестве части идентичности последовательности. Процент идентичности можно измерять с использованием программ или алгоритмов для сравнения последовательностей, или путем визуальной инспекции. В данной области известны различные алгоритмы и программы, которые могут быть использованы для выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, набор программ BLAST, доступный от Национального центра биотехнологической информации правительства США по сетевому адресу BLAST. Сравнения между двумя последовательностями можно проводить с использованием либо алгоритма BLASTN, либо BLASTP. BLASTN используют для сравнения нуклеотидных последовательностей, в то время как BLASTP используют для сравнения аминокислотных последовательностей. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или MegAlign, доступная от DNASTAR, являются дополнительными общедоступными компьютерными программами, которые могут быть использованы для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области может определять

соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретных программ для выравнивания последовательностей. В конкретных вариантах осуществления в программах выравнивания используют параметры по умолчанию.

[00354] Используемый в настоящем документе термин «вариант» включает, но не ограничивается ими, антитела или слитые белки, которые содержат аминокислотную последовательность, отличающуюся от аминокислотной последовательности эталонного антитела одной или более заменами, делециями и/или добавлениями в некоторых положениях внутри или по краям аминокислотной последовательности эталонного антитела. Вариант может иметь одну или более консервативных замен в его аминокислотной последовательности в сравнении с аминокислотной последовательностью эталонного антитела. Консервативные замены могут включать, например, замену на одинаково заряженные или незаряженные аминокислоты. Вариант сохраняет способность эталонного антитела специфически связывать антиген. Термин «вариант» также охватывает пегилированные антитела или белки.

[00355] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты», или «ОИЛ», означает популяцию клеток, исходно полученную в виде белых клеток крови, которые покидают кровотока в организме субъекта и мигрируют в опухоль. ОИЛ включают, но без ограничения, $CD8^+$ 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 описано в настоящем документе (в настоящем документе их иногда называют «свежесобранные»), и «вторичные ОИЛ» представляют собой любые клеточные популяции ОИЛ, которые размножились или пролиферировали, как описано в настоящем документе, включая, но без ограничения, суммарные ОИЛ и размноженные ОИЛ («ПБР ОИЛ»), а также «ре-ПБР ОИЛ», описанные в настоящем документе. Ре-ПБР ОИЛ могут включать, например, ОИЛ из второго размножения или ОИЛ из второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 8, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ).

[00356] В целом, ОИЛ можно характеризовать либо биохимически, по клеточным поверхностным маркерам, либо функционально, по их способности к инфильтрации опухолей и эффективному лечению. ОИЛ, как правило, можно относить к определенной категории на основании экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Дополнительно, и альтернативно, ОИЛ могут быть функционально охарактеризованы по их способности к инфильтрации солидных опухолей после повторного введения в организм пациента. ОИЛ также могут быть охарактеризованы по активности - например, ОИЛ можно считать эффективными, если, например, секреция интерферона (IFN) превышает примерно 50 пг/мл, превышает примерно 100 пг/мл, превышает примерно 150 пг/мл или превышает примерно 200 пг/мл.

[00357] Термин «дезоксирибонуклеотид» охватывает природные и синтетические, не модифицированные и модифицированные дезоксирибонуклеотиды. Модификации включают изменение сахарного фрагмента, фрагмента основания и/или связей между дезоксирибонуклеотидами в олигонуклеотиде.

[00358] Термин «РНК» означает молекулу, содержащую по меньшей мере один рибонуклеотидный остаток. Термин «рибонуклеотид» означает нуклеотид с гидроксильной группой в 2'-положении β-D-рибофуранозного фрагмента. Термин «РНК» охватывает двухцепочечную РНК, одноцепочечную РНК, выделенную РНК, например, частично очищенную РНК, практически чистую РНК, синтетическую РНК, полученную рекомбинантными методами РНК, а также модифицированную РНК, которая отличается от природной РНК за счет добавления, делеции, замены и/или изменения одного или более нуклеотидов. Нуклеотиды молекул РНК, описанных в настоящем документе, также могут включать нестандартные нуклеотиды, например, неприродные нуклеотиды или химически синтезированные нуклеотиды, или дезоксинуклеотиды. Такие модифицированные РНК могут быть названы аналогами или аналогами природных РНК.

[00359] Термин «модифицированный нуклеотид» означает нуклеотид, который имеет одну или более модификаций в нуклеозиде, нуклеиновом основании, пентозном кольце или фосфатной группе. Например, модифицированные нуклеотиды не включают рибонуклеотиды, содержащие аденозинмонофосфат, гуанозинмонофосфат, уридинмонофосфат и цитидинмонофосфат, и дезоксирибонуклеотиды, содержащие дезоксиаденозинмонофосфат, дезоксигуанозинмонофосфат, дезокситимидинмонофосфат и дезоксицитидинмонофосфат. Модификации включают те природные модификации, которые появляются в результате изменений за счет ферментов, модифицирующих нуклеотиды, таких как метилтрансферазы.

[00360] Модифицированные нуклеотиды также включают синтетические или неприродные нуклеотиды. Нуклеотиды с синтетическими или неприродными модификациями включают те, которые имеют 2'-модификации, например, 2'-O-метил, 2'-метоксиэтокси, 2'-фтор, 2'-аллил, 2'-O-[2-(метиламино)-2-оксоэтил], 4'-тио, 4'-CH₂-O-2'-мост, 4'-(CH₂) 2-O-2'-мост, 2'-LNA и 2'-O--(N-метилкарбамат), или те, которые содержат аналоги основания. В случае 2'-модифицированных нуклеотидов, описанных в настоящем документе, «амино» означает 2'-NH₂ или 2'-O--NH₂, которые могут быть модифицированными или не модифицированными. Такие модифицированные группы описаны, например, в патентах США №№ 5672695 и 6248878; включенных в настоящий документ посредством ссылки.

[00361] Термины «микро-РНК» или «микроРНК» относятся к нуклеиновой кислоте, которая образует одноцепочечную РНК, и эта одноцепочечная РНК обладает способностью изменять экспрессию (уменьшать или ингибировать экспрессию; модулировать экспрессию; непосредственно или опосредованно усиливать экспрессию) гена, или гена-мишени, когда микроРНК экспрессируется в той же клетке, что и ген или ген-мишень. В одном варианте осуществления «микроРНК» означает нуклеиновую

кислоту, которая имеет существенную или полную идентичность с геном-мишенью и образует одноцепочечную микроРНК. В некоторых вариантах осуществления микроРНК может иметь форму пре-микроРНК, при этом пре-микроРНК представляет собой двухцепочечную РНК. Последовательность микроРНК может соответствовать полноразмерной последовательности гена-мишени или ее подпоследовательности. Как правило, микроРНК имеет длину по меньшей мере примерно 15-50 нуклеотидов (например, каждая последовательность одноцепочечной микроРНК имеет длину 15-50 нуклеотидов, и двухцепочечная пре-микроРНК имеет длину примерно 15-50 пар нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления микроРНК имеет длину 20-30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления микроРНК имеет длину 20-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления микроРНК имеет длину 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов.

[00362] Термин «ген-мишень» охватывает гены, известные или идентифицированные как гены, модулирующие экспрессию гена, вовлеченного в механизм иммунной резистентности, и может означать один из нескольких групп генов, например, супрессорных рецепторов, например, CTLA4 и PD1; цитокиновых рецепторов, которые инактивируют иммунные клетки, например, рецептор TGF-бета, LAG3 и/или TIM3, а также их сочетания. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень включает один или более из PD-1, TGFBR2, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 внутриклеточного домена (ICD), NOTCH лиганда mDLL1, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимой протеинкиназы А (РКА).

[00363] Термины «короткая интерферирующая РНК» или «киРНК», или «малая интерферирующая РНК», или «выключающая РНК» относятся к группе двухцепочечных молекул РНК, имеющих смысловую и антисмысловую цепи РНК, каждую длиной примерно 1022 нуклеотидов, необязательно, включая выступающий 3'-фрагмент из 1-3 нуклеотидов. киРНК является активной в пути РНК-интерференции (РНКи) и препятствует экспрессии специфических генов-мишеней с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

[00364] Термин «сд-РНК» относится к «самодоставляемым» средствам РНКи, которые образуются в виде асимметричного двухцепочечного гибрида РНК-антисмысловой олигонуклеотид. Двухцепочечная РНК включает направляющую (смысловую) цепь длиной примерно 19-25 нуклеотидов и «пассажирскую» (антисмысловую) цепь длиной примерно 10-19 нуклеотидов в форме дуплекса, с имеющимся одноцепочечным фосфоротиолированным «хвостом» из примерно 5-9 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательности РНК могут быть изменены за счет стабилизирующих и гидрофобных модификаций, например, стеролов, например, холестерина, витамина D, нафтила, изобутила, бензила, индола, триптофана и

фенила, которые придают стабильность и способствуют эффективному поглощению клеткой без какого-либо реагента или препарата для трансфекции. В некоторых вариантах осуществления анализа иммунного ответа для тестирования IFN-индуцируемых белков указывают на то, что сд-РНК отличаются редуцированным профилем иммуностимуляции в сравнении с другими средствами РНКи. Смотри, например, публикацию Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864, включенную посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, описанные в настоящем документе, коммерчески доступны от компании Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[00365] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемый эксципиент» должны включать любые, и все, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и замедляющие абсорбцию средства, а также инертные ингредиенты. Использование таких фармацевтически приемлемых носителей, или фармацевтически приемлемых эксципиентов, для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда какой-либо общепринятый фармацевтически приемлемый носитель, или фармацевтически приемлемый эксципиент, несовместим с активным фармацевтическим ингредиентом, его использование в терапевтических композициях по изобретению подразумевается. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут быть включены в описанные композиции и способы.

[00366] Термины «примерно» и «приблизительно» означают «в пределах статистически значимого диапазона величины». Такой диапазон может находиться в пределах порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, еще более предпочтительно в пределах 10%, и даже более предпочтительно в пределах 5% от указанного значения или диапазона. Допустимая вариация, охваченная терминами «примерно» или «приблизительно», зависит от конкретной изучаемой системы, и может быть с легкостью определена специалистом в данной области. Кроме того, используемые в настоящем документе термины «примерно» и «приблизительно» означают, что расстояния, размеры, составы, параметры, формы, а также другие количественные показатели и характеристики, не являются и не обязательно должны быть точными, но могут быть примерными и/или большими или меньшими, при необходимости, отражая допустимые отклонения, коэффициенты пересчета, округление значений, погрешности измерений и тому подобное, а также другие факторы, известные специалистам в данной области. Как правило, расстояния, размеры, составы, параметры, формы, а также другие количественные показатели и характеристики, являются «примерными» или «приблизительными», независимо от того, указано ли это специально. Следует отметить, что для вариантов осуществления с разными размерами, формами и пропорциями можно использовать описанные условия.

[00367] Переходные термины «включающий», «состоящий в основном из» и

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

III. Способы временного изменения экспрессии белков в ОИЛ

[00368] В некоторых вариантах осуществления размноженные ОИЛ по настоящему изобретению подвергают дополнительным манипуляциям до, во время или после этапа размножения, в том числе, в течение процессов производства в закрытых стерильных условиях, описанных в настоящем документе, с целью изменения экспрессии белков. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит вследствие временного редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления размноженные ОИЛ по настоящему изобретению обрабатывают транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков в ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ТФ и/или другие молекулы, которые способны временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в популяции ОИЛ.

[00369] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает редактирование генов за счет вставки нуклеотидов, например, за счет введения рибонуклеиновой кислоты (РНК), включая введение матричной РНК (мРНК) или короткой (или малой) интерферирующей РНК (киРНК), в популяцию ОИЛ для стимуляции экспрессии одного или более белков, или ингибирования экспрессии одного или более белков, а также одновременных сочетаний стимуляции одного набора белков с ингибированием другого набора белков.

[00370] В некоторых вариантах осуществления в размноженных ОИЛ по настоящему изобретению происходит временное изменение экспрессии белков. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит в суммарной популяции ОИЛ до первого размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ, полученной, например, на этапе А, как указано на Фигуре 8. В

некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит во время первого размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ, размноженной, например, на этапе В, как указано на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит после первого размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ в переходный период между первым и вторым размножением, популяции ОИЛ, полученной, например, на этапе В и включенной в этап С, как показано на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит в суммарной популяции ОИЛ до второго размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ, полученной, например, на этапе С, и до ее размножения на этапе D, как указано на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит в процессе второго размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ, размноженной, например, на этапе D, как указано на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков происходит после второго размножения, в том числе, например, в популяции ОИЛ, полученной после размножения, например, на этапе D, как указано на Фигуре 8.

[00371] В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белков в популяции ОИЛ включает этап электропорации. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белков в популяции ОИЛ применяют в соответствии со способами, представленными на Фигуре 30 и Фигуре 31. Методы электропорации известны в данной области и описаны, например, в публикации Tsong, *Biophys. J.* **1991**, 60, 297-306 и публикации патентной заявки США № 2014/0227237 A1, содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белков в популяции ОИЛ включает этап трансфекции с фосфатом кальция. Методы трансфекции с фосфатом кальция (осаждение ДНК фосфатом кальция, покрытие клеточной поверхности и эндоцитоз) известны в данной области и описаны в Graham and van der Eb, *Virology* **1973**, 52, 456-467; Wigler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1979**, 76, 1373-1376; и Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* **1987**, 7, 2745-2752; а также в патенте США № 5593875, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белков в популяции ОИЛ включает этап липосомной трансфекции. Методы липосомной трансфекции, например, такие методы, в которых используют 1:1 (масс/масс) липосомный препарат катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-n, n,n-триметиламмоний хлорида (DOTMA) и диолеоилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в фильтрованной воде, известны в данной области и описаны в Rose, et al., *Biotechniques* **1991**, 10, 520-525 и Felgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 7413-7417, а также в патентах США №№ 5279833; 5908635; 6056938; 6110490; 6534484 и 7687070, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ временного изменения экспрессии белков в популяции ОИЛ включает этап трансфекции с использованием способов, описанных в патентах США №№

5766902; 6025337; 6410517; 6475994 и 7189705; содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00372] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличению количества стволовых Т-клеток памяти (TSCM). TSCM являются ранними предшественниками испытывающих воздействие антигена центральных Т-клеток памяти. TSCM, как правило, демонстрируют долгосрочное выживание, самообновление и свойства мультипотентности, которые характерны для стволовых клеток, и, как правило, желательны для создания эффективных препаратов ОИЛ. TSCM продемонстрировали повышенную противоопухолевую активность в сравнении с другими подмножествами Т-клеток в мышинных моделях адоптивного клеточного переноса (Gattinoni et al. *Nat Med* 2009, 2011; Gattinoni, *Nature Rev. Cancer*, 2012; Cieri et al. *Blood* 2013). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к получению популяции ОИЛ, имеющей высокое процентное содержание TSCM. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличению на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% процентного содержания TSCM. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличению по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз или 10 раз содержания TSCM в популяции ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к получению популяции ОИЛ с по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% TSCM. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к получению терапевтической популяции ОИЛ с по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% TSCM.

[00373] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к восстановлению испытывающих воздействие антигена Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления восстановление включает, например, увеличение пролиферации, увеличение Т-клеточной активации и/или более эффективное узнавание

антигена.

[00374] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков изменяет экспрессию в большой доле Т-клеток с целью сохранения репертуара TCR опухолевого происхождения. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков не приводит к изменению репертуара TCR опухолевого происхождения. В некоторых вариантах осуществления при временном изменении экспрессии белков сохраняется репертуар TCR опухолевого происхождения.

[00375] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к изменению экспрессии конкретного гена. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на ген, включая, но без ограничения, PD-1 (также называемый PDCD1 или CD279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимую протеинкиназу А (PKA). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на PD-1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на TGFBR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR4/5. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR (химерные костимулирующие рецепторы). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-7. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-10. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-12. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-15. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на IL-21. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на NOTCH 1/2 ICD.

[00376] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на сигнальный путь NOTCH, например, через NOTCH 1/2 ICD и/или

через другой лиганд NOTCH, такой как mDLL1 (смотри, например, Kondo, T. et al., NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy, Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017), полное содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00377] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на TIM3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на TIGIT. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на TGF β . В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR4. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCR5. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CXCR1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CXCR2. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CSCR3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL2 (MCP-1). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL3 (MIP-1 α). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL4 (MIP1- β). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL5 (RANTES). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CXCL1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CXCL8. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL22. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CCL17. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на VHL. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на CD44. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на PIK3CD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на SOCS1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на цАМФ-зависимую протеинкиназу А (РКА).

[00378] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии хемокинового рецептора. В некоторых вариантах осуществления хемокиновый рецептор, который избыточно экспрессируется в результате временного изменения экспрессии белков, включает рецептор с лигандом, который включает, но не ограничивается ими, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 и/или CCL17. В

некоторых вариантах осуществления хемокиновый рецептор, который избыточно экспрессируется в результате временного изменения экспрессии белков, включает рецептор с лигандом, который включает, но не ограничивается ими, IL-2, IL-7, IL-10, IL-15 и IL-21, а также NOTCH 1/2 внутриклеточный домен (ICD). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на сигнальный путь NOTCH, например, через NOTCH 1/2 ICD и/или через другой лиганд NOTCH, такой как mDLL1 (смотри, например, Kondo, T. et al., NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy, Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017), полное содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки).

[00379] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGF β R2 и/или TGF β (в том числе приводит, например, к блокированию пути TGF β). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии CBLB (CBL-B). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии CISH.

[00380] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии хемокиновых рецепторов, например, для улучшения направленной миграции или перемещения к зоне опухоли ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии CCR (химерный костимулирующий рецептор). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии хемокинового рецептора, выбранного из группы, состоящей из CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 и/или CSCR3.

[00381] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии интерлейкина. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии интерлейкина, выбранного из группы, состоящей из IL-2, IL-12, IL-15 и/или IL-21.

[00382] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков направлено на сигнальный путь NOTCH, например, через NOTCH 1/2 ICD и/или через другой лиганд NOTCH, такой как mDLL1 (смотри, например, Kondo, T. et al., NOTCH-mediated conversion of activated T cells into stem cell memory-like T cells for adoptive immunotherapy, Nature Communications, Vol. 8, Article number: 15338 (2017), полное содержание публикации включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии NOTCH 1/2 ICD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или

избыточной экспрессии лиганда NOTCH, такого как mDLL1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии VHL. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии CD44. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии PIK3CD. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к увеличенной и/или избыточной экспрессии SOCS1.

[00383] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA).

[00384] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1 и одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1 и одного из LAG3, CISH, CBLB, TIM3, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1 и LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии PD-1 и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии LAG3 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии LAG3 и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии CISH и CBLB. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии TIM3 и PD-1. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии TIM3 и

LAG3. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии TIM3 и CISH. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии TIM3 и CBLB.

[00385] В некоторых вариантах осуществления молекулу адгезии, выбранную из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний, вводят методом гамма-ретровирусной или лентивирусной трансдукции в первую популяцию ОИЛ, вторую популяцию ОИЛ или собранную популяцию ОИЛ (например, экспрессия молекулы адгезии увеличивается).

[00386] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний, и увеличенной и/или усиленной экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшенной и/или редуцированной экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB, а также их сочетаний, и увеличенной и/или усиленной экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний.

[00387] В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на примерно 5%, примерно 10%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 99%.

[00388] В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на примерно 5%, примерно 10%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 25%, примерно

30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии на по меньшей мере примерно 99%.

[00389] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков индуцируют путем обработки ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков в ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления для внутриклеточной доставки транскрипционных факторов (ТФ) и/или других молекул, способных временно изменять экспрессию белков, используют безвекторную микрофлюидную платформу SQZ. Такие способы, которые могут быть использованы для доставки белков, включая транскрипционные факторы, в разные первичные человеческие клетки, включая Т-клетки (Sharei et al. PNAS 2013, а также Sharei et al. PLOS ONE 2015 и Greisbeck et al. J. Immunology vol. 195, 2015), были описаны, в том числе быстрые способы деформации клеток с использованием микрофлюидного сжатия, в результате чего ТФ или другая молекула проникает в клетки; смотри, например, публикации международных патентных заявок №№ WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 или WO 2017/123663A1, или публикации патентных заявок США №№ US 2014/0287509A1, US 2018/0201889A1 или US 2018/0245089A1, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Такие способы, как описанные в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 или WO 2017/123663A1, или публикациях патентных заявок США №№ US 2014/0287509A1, US 2018/0201889A1 или US 2018/0245089A1, могут быть использованы с настоящим изобретением для воздействия на популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными индуцировать временную экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные индуцировать временную экспрессию белков, обеспечивают увеличение

экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в популяции ОИЛ, таким образом, приводя к перепрограммированию популяции ОИЛ и увеличению терапевтической эффективности перепрограммированной популяции ОИЛ в сравнении с не перепрограммированной популяцией ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению субпопуляции эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти относительно исходной или предшествующей (то есть, до перепрограммирования) популяции ОИЛ, как описано в настоящем документе.

[00390] В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) включает, но не ограничивается ими, TCF-1, NOTCH 1/2 ICD и/или MYB. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) представляет собой TCF-1. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) представляет собой NOTCH 1/2 ICD. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) представляет собой MYB. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) вводят с культурой индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), например, коммерчески доступной KNOCKOUT Serum Replacement (Gibco/ThermoFisher), для индукции дополнительного перепрограммирования ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) вводят с коктейлем iPSC для индукции дополнительного перепрограммирования ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления транскрипционный фактор (ТФ) вводят без коктейля iPSC. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению процентного содержания TSCM. В некоторых вариантах осуществления перепрограммирование приводит к увеличению процентного содержания TSCM на примерно 5%, примерно 10%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95% TSCM.

[00391] В некоторых вариантах осуществления способ размножения опухоле-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

- (i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента;
- (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ;
- (iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

[00392] В одном из вариантов осуществления способ размножения опухолеинфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей

диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап стерильной электропорации включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

[00393] В одном варианте осуществления способ размножения опухоле-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа SQZ микрофлюидного разрыва мембран на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе SQZ микрофлюидного разрыва мембран происходит перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап SQZ микрофлюидного разрыва мембран включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

[00394] В некоторых вариантах осуществления способ временного изменения экспрессии белков, описанный выше, можно комбинировать со способом генетической модификации популяции ОИЛ, включающим этап стабильного встраивания генов для продуцирования одного или более белков. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции ОИЛ включает этап ретровирусной трансдукции. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции ОИЛ включает этап лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области и описаны, например, в публикациях Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. **2006**, 103, 17372-77; Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. **1997**, 15, 871-75; Dull, et al., J. Virology **1998**, 72, 8463-71, и патенте США № 6627442, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции ОИЛ включает этап гамма-ретровирусной трансдукции. Системы гамма-ретровирусной трансдукции известны в данной области и описаны, например, в публикации Serko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. **1996**, 9.9.1-9.9.16, включенной в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления способ генетической модификации популяции ОИЛ включает этап опосредованного транспозоном переноса генов. Системы опосредованного транспозоном переноса генов известны в данной области и включают системы, в которых транспозазу предоставляют в виде ДНК-содержащего экспрессионного вектора или в виде экспрессируемой РНК, или белка, так что долгосрочная экспрессия транспозазы отсутствует в трансгенных клетках, например, транспозазу предоставляют в виде мРНК (например, мРНК, содержащей кэп и поли-А «хвост»). Подходящие опосредуемые транспозонами системы, включая Tel-подобную транспозазу лососевых (транспозаза SB или «спящая красавица»), например, SB10, SB11 и SB100x, и генетически модифицированные ферменты с повышенной ферментативной активностью описаны, например, в публикации Hackett, et al., Mol. Therapy **2010**, 18, 674-83 и патенте США № 6489458, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00395] В одном из вариантов осуществления способ размножения опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей

антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа стерильной электропорации или этапа SQZ микрофлюидного разрыва мембран на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации или этапе SQZ микрофлюидного разрыва мембран происходит перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап электропорации включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний, и, кроме того, при этом молекулу адгезии, выбранную из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний, вводят методом гамма-ретровирусной или лентивирусной трансдукции в первую популяцию ОИЛ, вторую популяцию ОИЛ или собранную популяцию ОИЛ.

[00396] В некоторых вариантах осуществления временное изменение экспрессии белков представляет собой уменьшение экспрессии, индуцированное интерференцией самодоставляемой РНК (сд-РНК), которая представляет собой химически синтезированный асимметричный дуплекс кРНК с высоким процентным содержанием 2'-ОН замен (как правило, фтором или -ОСН₃), который содержит 20-нуклеотидную

антисмысловую (направляющую) цепь и 13-15-нуклеотидную смысловую (пассажирскую) цепь, конъюгированную с холестерином на ее 3'-конце с использованием тетраэтиленгликольного (ТЭГ) линкера. Способы использования сд-РНК описаны в публикациях Khvorova and Watts, *Nat. Biotechnol.* **2017**, 35, 238-248; Byrne, et al., *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **2013**, 29, 855-864; и Ligtenberg, et al., *Mol. Therapy*, **2018**, в печати, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления доставку сд-РНК в популяцию ОИЛ осуществляют без использования электропорации, SQZ или других способов, и вместо этого используют 1-3-дневный период времени, в течение которого на популяцию ОИЛ воздействует сд-РНК в концентрации 1 мкМ/10000 ОИЛ в среде. В одном из вариантов осуществления доставку сд-РНК в популяцию ОИЛ выполняют с использованием 1-3-дневного периода времени, в течение которого на популяцию ОИЛ воздействует сд-РНК в концентрации 10 мкМ/10000 ОИЛ в среде. В одном из вариантов осуществления доставку сд-РНК в популяцию ОИЛ выполняют с использованием 1-3-дневного периода времени, в течение которого на популяцию ОИЛ воздействует сд-РНК в концентрации 50 мкМ/10000 ОИЛ в среде. В одном из вариантов осуществления доставку сд-РНК в популяцию ОИЛ выполняют с использованием 1-3-дневного периода времени, в течение которого на популяцию ОИЛ воздействует сд-РНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 ОИЛ до 50 мкМ/10000 ОИЛ в среде. В одном из вариантов осуществления доставку сд-РНК в популяцию ОИЛ выполняют с использованием 1-3-дневного периода времени, в течение которого на популяцию ОИЛ воздействует сд-РНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 ОИЛ до 50 мкМ/10000 ОИЛ в среде, при этом воздействие сд-РНК проводят два, три, четыре или пять раз путем добавления свежей сд-РНК в среду. Другие подходящие способы описаны, например, в публикациях патентных заявок США №№ US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1 и US 2013/0131142 A1, и патенте США № 9080171, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00397] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК вводят в популяцию ОИЛ в процессе производства с использованием способа, представленного на Фигуре 32. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК кодирует РНК, которая интерферирует с NOTCH 1/2 ICD, NOTCH лигандом mDLL1, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGF β , TGFBR2, цАМФ-зависимой протеинкиназой А (РКА), BAFF BR3, CISH и/или CBLB. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии определяют на основании процентного выключения гена, например, при оценке методом проточной цитометрии и/или кПЦР. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на примерно 5%, примерно 10%, примерно 10%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В

некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%, примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%, примерно 90% или примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 80%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 85%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления имеет место уменьшение экспрессии на по меньшей мере примерно 99%.

[00398] В одном из вариантов осуществления способ размножения опухоле-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, одной или более самодоставляемых РНК (сд-РНК), необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (е) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (е) в (f) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом одна или более сд-РНК временно ингибируют экспрессию молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PКА, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

[00399] В одном из вариантов осуществления способ размножения опухолевых инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, одной или более самодоставляемых РНК (сд-РНК), необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (е) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (е) в (f) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом одна или более сд-РНК временно ингибируют экспрессию молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2,

РКА, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний, и, кроме того, при этом молекулу адгезии, выбранную из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний, вводят методом гамма-ретровирусной или лентивирусной трансдукции в первую популяцию ОИЛ, вторую популяцию ОИЛ или собранную популяцию ОИЛ.

А. Способы с использованием сд-РНК

[00400] Технология самодоставляемой РНКи, основанная на химической модификации ксРНК, может быть использована со способами по настоящему изобретению для успешной доставки сд-РНК в ОИЛ, как описано в настоящем документе. Сочетание модификаций каркаса с асимметричной структурой ксРНК и гидрофобным лигандом (смотри, например, Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, **2018** и публикацию патента США № 20160304873, а также Фигуры 36 и 37 в настоящем документе) позволяют сд-РНК проникать в культивируемые клетки млекопитающих без использования дополнительных препаратов и методов за счет простого добавления в культуральную среду, благодаря устойчивости сд-РНК к нуклеазам. Эта устойчивость позволяет поддерживать постоянные уровни РНКи-опосредованного уменьшения активности гена-мишени просто за счет поддержания активной концентрации сд-РНК в среде. Без связи с конкретной теорией, стабилизация каркаса сд-РНК обеспечивает более длительные эффекты уменьшения экспрессии гена, которые могут продолжаться в течение нескольких месяцев в неделящихся клетках.

[00401] В одном из вариантов осуществления сд-РНК, используемая в настоящем документе для таргетирования генов, раскрытых в настоящем документе, имеет структуру, показанную на Фигуре 36 или Фигуре 37.

[00402] В некоторых вариантах осуществления имеет место более чем 95% эффективность трансфекции ОИЛ и уменьшение экспрессии мишени за счет различных специфических сд-РНК. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, содержащую несколько не модифицированных остатков рибозы, заменяли полностью модифицированными последовательностями для повышения эффективности и/или долговечности эффекта РНКи. В некоторых вариантах осуществления эффект уменьшения экспрессии сохраняется в течение 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней или более. В некоторых вариантах осуществления эффект уменьшения экспрессии снижается через 10 дней или более после воздействия сд-РНК на ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления сохраняется более чем 70% уменьшение экспрессии мишени. В некоторых вариантах осуществления сохраняется более чем 70% уменьшение экспрессии мишени в ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии в пути PD-1/PD-L1 позволяет ОИЛ проявлять более сильный эффект *in vivo*, что в некоторых вариантах осуществления является следствием избегания подавляющих эффектов пути PD-1/PD-L1. В некоторых вариантах осуществления уменьшение экспрессии PD-1 за счет сд-РНК приводит к увеличению пролиферации ОИЛ.

1. Выбор и признаки сд-РНК

а. Структура олигонуклеотида сд-РНК

[00403] Короткая интерферирующая РНК (киРНК), также известная как малая интерферирующая РНК или «выключающая РНК», представляет собой двухцепочечную молекулу РНК длиной, как правило, 19-25 пар нуклеотидов. киРНК используют в РНК-интерференции (РНКи), при этом она препятствует экспрессии конкретных генов с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

[00404] Термин «двухцепочечная РНК (дцРНК)», в целом, можно использовать для обозначения любой молекулы, содержащей пару комплементарных цепей РНК, как правило, смысловую (пассажирскую) и антисмысловую (направляющую) цепи, которая может иметь одноцепочечные выступающие области. Термин «дцРНК», в отличие от киРНК, как правило, относится к молекуле-предшественнику, включающей последовательность молекулы киРНК, которая высвобождается из большей молекулы дцРНК в результате действия систем расщепляющих ферментов, включая Dicer.

[00405] сд-РНК (самодоставляемые РНК) представляют собой новый класс ковалентно модифицированных соединений РНКи, которые не нуждаются в системе доставки для проникновения в клетки и имеют улучшенные фармакологические свойства в сравнении с традиционными киРНК. «Самодоставляемая РНК», или «сд-РНК», представляет собой гидрофобно модифицированный гибрид интерферирующей РНК-антисмыслового олигонуклеотида, который продемонстрировал высокую эффективность *in vitro* в первичных клетках и *in vivo* при локальном введении. Было продемонстрировано устойчивое поглощение клетками и/или подавление экспрессии генов без токсичности. Молекулы сд-РНК, как правило, представляют собой асимметричные химически модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты с минимальными двухцепочечными областями. Молекулы сд-РНК, как правило, содержат одноцепочечные области и двухцепочечные области, и могут иметь различные химические модификации как в одноцепочечных, так и в двухцепочечных, областях молекулы. Кроме того, молекулы сд-РНК могут быть связаны с гидрофобным конъюгатом, таким как обычная и усовершенствованная молекула типа стерола, как описано в настоящем документе. Молекулы сд-РНК (и/или РНК, которые могут быть использованы таким же образом, как сд-РНК) и связанные способы получения таких сд-РНК подробно описаны, например, в публикации патента США № US 2016/0304873, публикации международной патентной заявки № WO2010/033246, публикации международной патентной заявки № WO2017/070151, публикации международной патентной заявки № WO2009/102427, публикации международной патентной заявки № WO201/1119887, публикации международной патентной заявки № WO2010/033247, публикации международной патентной заявки № WO2009045457, публикации международной патентной заявки № WO2011/119852, публикации международной патентной заявки № WO2011/119871, публикации патента США № US 2011/0263680, публикации международной патентной заявки № WO2010/033248, публикации международной патентной заявки № WO2010/078536, публикации международной патентной заявки № WO2010/090762,

публикации патента США № US 20110039914, публикации международной патентной заявки № WO2011/109698, публикации международной патентной заявки № WO2010/090762, патенте США № US 8815818, публикации международной патентной заявки № WO2016/094845, публикации международной патентной заявки № WO2017/193053, публикации патента США № US 2006/0276635, публикации международной патентной заявки № WO2001/009312, публикации патента США № US 2017/0043024, публикации патента США № US 2017/0312367, публикации патента США № US 2016/0319278, публикации патента США № US 2017/0369882, патенте США № US 8501706, публикации патента США № US 2004/0224405, патенте США № US 8252755, публикации патента США № US 2007/0031844, публикации патента США № US 2007/0039072, публикации патента США № US 2007/0207974, публикации патента США № US 2007/0213520, публикации патента США № US 2007/0213521, публикации патента США № US 2007/0219362, публикации патента США № US 2007/0238868, публикации патента США № US 2014/0148362, публикации патента США № US 2016/0193242, публикации патента США № US 2016/01946461, публикации патента США № US 2016/0201058, публикации патента США № US 2016/0201065, публикации патента США № US 2017/0349904, публикации патента США № US 2018/0119144, патенте США № US 7834170, патенте США № US 8090542 и публикации патента США № US 2012/0052487, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей; кроме того, сд-РНК коммерчески доступны от компании Advirna LLC, Worcester, MA, USA. Для оптимизации структуры, химического состава, положения таргетирования, предпочтений последовательностей сд-РНК, и тому подобного, был разработан патентованный алгоритм и использован для предсказания эффективности сд-РНК (смотри, например, US 20160304873). На основании этих анализов функциональные последовательности сд-РНК, в целом, были определены, как приводящие к более чем 70% уменьшению экспрессии при концентрации 1 мкМ, с вероятностью выше 40%.

b. Структура олигонуклеотида сд-РНК

[00406] В некоторых вариантах осуществления одна или более сд-РНК для использования по настоящему изобретению могут быть получены с линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления линейная двухцепочечная ДНК-матрица для получения одной или более сд-РНК является такой, как описанная в патенте США № US 8859229, а также описанная ниже.

[00407] В некоторых вариантах осуществления линейная двухцепочечная ДНК-матрица, полученная методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подходящая для *in vitro* транскрипции мРНК, содержит от 5' к 3'-концу: промотор РНК-полимеразы на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, 5'-нетранслируемую область длиной менее 3000 нуклеотидов и эффективную для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, при этом полипептид является гетерологичным для клетки, которая будет трансфицирована, и при этом полипептид выбирают из группы, состоящей

из лиганда или рецептора иммунной клетки, полипептида, который стимулирует или ингибирует функцию иммунной системы, и полипептида, который ингибирует функцию онкогенного полипептида, 3'-нетранслируемую область, эффективную для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, и поли(А) участок из 50-5000 нуклеотидов на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, при этом промотор является гетерологичным для открытой рамки считывания, и при этом ДНК-матрица не содержится в ДНК-содержащем векторе и заканчивается 3'-концом поли (А) участка. В некоторых вариантах осуществления промотор РНК-полимеразы содержит консенсусную последовательность связывания для РНК-полимеразы, выбранной из группы, состоящей из РНК полимеразы Т7, Т3 или SP6. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания кодирует слитый полипептид. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGFβ, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1, цАМФ-зависимой протеинкиназы А (РКА), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления открытая рамка считывания кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, РКА, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления линейная двухцепочечная молекула дополнительно содержит внутренний участок связывания рибосомы. В некоторых вариантах осуществления поли(А) участок имеет длину 300-400 нуклеотидов.

[00408] В некоторых вариантах осуществления линейная двухцепочечная ДНК-матрица по п. 1 от 5' к 3'-концу состоит из промотора РНК-полимеразы на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, 5'-нетранслируемой области длиной менее 3000 нуклеотидов и эффективной для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, открытой рамки считывания, кодирующей полипептид, при этом полипептид является гетерологичным для клетки, которая будет трансфицирована, и при этом полипептид выбирают из группы, состоящей из лиганда или рецептора иммунной клетки, полипептида, который стимулирует или ингибирует функцию иммунной системы, и полипептида, который ингибирует функцию онкогенного полипептида, 3'-нетранслируемой области, эффективной для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, и поли(А) участка из 50-5000 нуклеотидов на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, при этом промотор является гетерологичным для открытой рамки считывания, и при этом ДНК-матрица не содержится в ДНК-содержащем векторе и заканчивается 3'-концом поли (А) участка. В некоторых вариантах осуществления 3'-нетранслируемая область имеет длину по меньшей мере 100 нуклеотидов.

[00409] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

способу получения линейной двухцепочечной ДНК-матрицы, описанной выше, включающему получение прямого и обратного праймеров, при этом прямой праймер содержит множество нуклеотидов, которые в значительной степени комплементарны не кодирующей цепи интересующей двухцепочечной ДНК-мишени, и множество нуклеотидов, которые действуют в качестве сайта связывания РНК-полимеразы, при этом обратный праймер содержит множество нуклеотидов, которые в значительной степени комплементарны кодирующей цепи интересующей двухцепочечной ДНК-мишени, и множество дезокситимидиновых нуклеотидов, и проведение методом полимеразной цепной реакции амплификации ДНК-мишени с использованием прямого и обратного праймеров, с получением линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения линейной двухцепочечной ДНК-матрицы, описанному выше, при этом способ включает получение прямого и обратного праймеров, при этом прямой праймер содержит множество нуклеотидов, которые в значительной степени комплементарны области нуклеотидов, находящихся непосредственно выше интересующей двухцепочечной ДНК-мишени, при этом обратный праймер содержит множество нуклеотидов, которые в значительной степени комплементарны области нуклеотидов, находящихся непосредственно ниже интересующей двухцепочечной ДНК-мишени, и проведение методом полимеразной цепной реакции амплификации ДНК-мишени с использованием прямого и обратного праймеров, с получением линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления праймеры содержат нуклеотидные последовательности, которые в значительной степени комплементарны нуклеотидным фрагментам в 5' и 3'-нетранслируемых областях интересующей двухцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления праймеры содержат нуклеотидные последовательности, которые в значительной степени комплементарны нуклеотидным фрагментам в открытой рамке считывания интересующей двухцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления праймеры содержат нуклеотидные последовательности, которые в значительной степени комплементарны нуклеотидным фрагментам в открытой рамке считывания интересующей двухцепочечной ДНК, при этом праймеры дополнительно содержат нуклеотидные фрагменты, которые содержат 5' и 3'-нетранслируемые области, при этом нуклеотидный фрагмент в прямом праймере, который содержит 5'-нетранслируемую область, находится между нуклеотидами, содержащими промотор РНК-полимеразы, и нуклеотидами, которые в значительной степени комплементарны не кодирующей цепи интересующей двухцепочечной ДНК-мишени, и при этом нуклеотидный фрагмент в обратном праймере, который содержит 3'-нетранслируемую область, находится между множеством дезокситимидиновых нуклеотидов и нуклеотидами, которые в значительной степени комплементарны кодирующей цепи интересующей двухцепочечной ДНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления прямой праймер и открытая рамка считывания содержат консенсусную последовательность Козак.

[00410] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу получения одной или более РНК для трансфекции клеток, включающему проведение *in vitro* транскрипции с линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает использование поли(А)-полимеразы для удлинения поли(А) «хвоста» РНК одним или более адениновыми нуклеотидами или их аналогами. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает добавление нуклеотидов во время транскрипции, которые действуют в качестве 5'-кэпа для транскрибированной РНК. В некоторых вариантах осуществления РНК нацелена на полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1, цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления РНК нацелена на полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

[00411] В некоторых вариантах осуществления изобретения используют одну или более выделенных РНК, содержащих одну или более открытых рамок считывания, продуцированных с линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу экспрессии одной или более РНК в клетке, включающему создание контакта клеток с одной или более РНК, продуцированными с линейной двухцепочечной ДНК-матрицы. В некоторых вариантах осуществления РНК присутствуют в неравных молярных количествах для достижения разных уровней экспрессии РНК в клетках. В некоторых вариантах осуществления одна или более РНК нацелены на полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1, цАМФ-зависимой протеинкиназы А (PKA), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления одна или более РНК нацелены на полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

(i) Нетранслируемые области

[00412] Также могут быть использованы химические структуры, обладающие способностью повышать стабильность и/или эффективность трансляции. РНК предпочтительно имеют 5' и 3'-UTR. Приведенные ниже примеры показывают, что включение 5'-UTR из 44 пар нуклеотидов в ПЦР-матрицу позволяет достигать большей эффективности трансляции транскрибированной РНК CFP в сравнении с ПЦР-матрицами, содержащими 5'-UTR лишь из 6 пар нуклеотидов. Примеры также показывают, что

добавление 3'-UTR из 113 пар нуклеотидов позволяет достигать большей эффективности трансляции транскрибированной РНК СФР в сравнении с ПЦР-матрицами, содержащими 3'-UTR лишь из 11 пар нуклеотидов. Как правило, длина 3'-UTR превышает 100 нуклеотидов и, таким образом, 3'-UTR длиной более 100 нуклеотидов является предпочтительной. В одном варианте осуществления последовательность 3'-UTR содержит от 100 до 5000 нуклеотидов. Длина 5'-UTR не настолько важна, как длина 3'-UTR, и может быть меньшей. В одном варианте осуществления 5'-UTR имеет длину от нуля до 3000 нуклеотидов. Длину последовательностей 5' и 3'-UTR, добавляемых к кодирующей области, можно изменять разными способами, в том числе, но без ограничения, проектируя праймеры для ПЦР, которые отжигаются с разными областями UTR. Используя такой подход, специалист в данной области может изменять длину 5' и 3'-UTR, необходимую для достижения оптимальной эффективности трансляции после трансфекции транскрибированной РНК.

[00413] 5' и 3'-UTR могут быть существующими в природе, эндогенными 5' и 3'-UTR для интересующего гена. Альтернативно, можно добавлять последовательности UTR, которые не являются эндогенными для интересующего гена, путем включения последовательностей UTR в прямой и обратный праймеры или путем любых других модификаций матрицы. Использование последовательностей UTR, которые не являются эндогенными для интересующего гена, может быть полезным для изменения стабильности и/или эффективности трансляции РНК. Например, известно, что AU-богатые элементы в 3'-UTR последовательностях могут снижать стабильность мРНК. Таким образом, 3'-UTR может быть выбрана или спроектирована для повышения стабильности транскрибированной РНК на основании свойств UTR, которые хорошо известны в данной области.

[00414] В одном варианте осуществления 5'-UTR может содержать последовательность Козак эндогенного гена. Альтернативно, когда 5'-UTR, которая не является эндогенной для интересующего гена, добавляют с использованием ПЦР, как описано выше, консенсусная последовательность Козак может быть модифицирована путем добавления последовательности 5'-UTR. Последовательности Козак могут увеличивать эффективность трансляции некоторых РНК-транскриптов, но, по-видимому, они не являются необходимыми для эффективной трансляции всех РНК. Необходимость в последовательностях Козак для многих мРНК известна в данной области. В других вариантах осуществления 5'-UTR может быть получена из РНК-содержащего вируса, РНК-геном которого стабилен в клетках. В других вариантах осуществления можно использовать различные аналоги нуклеотидов в 3' или 5'-UTR, чтобы блокировать деградацию мРНК за счет экзонуклеаз.

(ii) Промотор РНК-полимеразы

[00415] Для создания возможности синтеза РНК с ДНК-матрицы без необходимости в клонировании гена промотор транскрипции должен быть присоединен к ДНК-матрице выше транскрибируемой последовательности. Последовательности

промотора РНК-полимеразы бактериофага могут быть присоединены к 5'-UTR разными методами генетической инженерии, такими как лигирование ДНК, или могут быть добавлены к прямому праймеру (5') последовательности, которая в значительной степени комплементарна ДНК-мишени. Когда последовательность, которая действует как промотор для РНК-полимеразы, добавляют к 5'-концу прямого праймера, промотор РНК-полимеразы включается в ПЦР-продукт выше открытой рамки считывания, которая должна быть транскрибирована. В одном предпочтительном варианте осуществления промотор представляет собой промотор полимеразы Т7, как описано выше. Другие полезные промоторы включают, но без ограничения, промоторы РНК-полимеразы Т3 и SP6. Консенсусные нуклеотидные последовательности для промоторов Т7, Т3 и SP6 известны в данной области.

(iii) Поли(А) «хвост» и 5'-кэп

[00416] В предпочтительном варианте осуществления мРНК имеет как кэп на 5'-конце, так и 3' поли(А) «хвост», которые определяют связывание рибосомы, инициацию трансляции и стабильность мРНК в клетке. На кольцевой ДНК-матрице, например, ДНК плазмиды, РНК-полимераза образует длинный конкатемерный продукт, который не подходит для экспрессии в эукариотических клетках. Транскрипция ДНК плазмиды, линейаризованной на конце 3'-UTR, приводит к образованию мРНК нормального размера, которая не эффективна в эукариотической трансфекции, даже если она полиаденилирована после транскрипции.

[00417] На линейной ДНК-матрице РНК-полимераза фага Т7 может удлинять 3'-конец транскрипта за пределы последнего нуклеотида матрицы (Schenborn and Mierendorf, *Nuc. Acids Res.*, 13:6223-36 (1985); Nacheva and Berzal-Herranz, *Eur. J. Biochem.*, 270:1485-65 (2003)). Это может приводить к сгибанию выступающего транскрипта, с последующим матричным обменом со второй цепью ДНК или транскрипцией самой РНК (Triana-Alonso et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6298-307 (1995); Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998); Macdonald et al., 1993), а затем к aberrантной транскрипции в обратном направлении и накоплению двухцепочечной РНК, которая может ингибировать экспрессию гена. Одной только линейаризации ДНК недостаточно для правильной транскрипции (Triana-Alonso et al., *J. Biol. Chem.*, 270:6298-307 (1995); Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., 1998 *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998); Macdonald et al., *J. Mol. Biol.*, 232:1030-47 (1993); Nakano et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 64:194-99 (1999), линейаризация ДНК плазмиды ниже поли(А/Т) участка из 64-100 нуклеотидов приводит к получению хороших матриц (Saeboe-Larssen et al., *J. Immunol. Meth.*, 259:191-203 (2002); Boczkowski et al., *Cancer Res.*, 60:1028-34 (2000); Elango et al., *Biochem Biophys Res Commun.*, 330:958-966 (2005)). Эндогенный сигнал терминации для РНК-полимеразы Т7 кодирует РНК, которая может складываться в структуру типа стебель-петля, за которой следует дорожка из остатков уридина (Dunn and Studier, *J. Mol. Biol.*, 166:477-535 (1983); Arnaud-Barbe et al., 1998 *Nuc. Acids Res.*, 26:3550-54 (1998)). Даже без шпилечной структуры дорожка из

синтезированных остатков уридина может ослаблять транскрипцию (Kiyama and Oishi, *Nuc. Acids Res.*, 24:4577-4583 (1996)). Было высказано предположение, что линейаризация ДНК плазмиды ниже поли(А/Т) участка, возможно, образует определенного типа «динамический» терминатор, предотвращающий потенциальную аберрантную транскрипцию: 3'-удлинение РНК-транскрипта над поли(А/Т) участком и транскрипция в обратном направлении будет создавать растущий подобный сигналу терминации сигнал--удлиненный поли(У) участок и поли(А/У) шпильку. Соответственно, обратные ПЦР-праймеры были спроектированы с 3'-фиксирующей последовательностью ниже гена GFP и 5'-участком поли(Т) из 100 нуклеотидов (Фигура 38).

[00418] Общепринятым способом встраивания полиА/Т участков в ДНК-матрицу является молекулярное клонирование. Однако полиА/Т последовательность, интегрированная в ДНК плазмиды, может вызывать нестабильность плазмиды, поэтому плазмидные ДНК-матрицы, полученные из бактериальных клеток, часто в высокой степени загрязнены делециями и другими абберациями. Это делает процедуру клонирования не только трудоемкой и отнимающей много времени, но часто и ненадежной. Вследствие этого, способ, делающий возможным конструирование ДНК-матриц с полиА/Т 3'-участком без клонирования, является крайне необходимым.

[00419] ПолиА/Т сегмент транскрипционной ДНК-матрицы может быть получен в процессе ПЦР с использованием обратного праймера, содержащего полиТ «хвост», такой как 100Т «хвост» (размер может составлять 50-5000 Т), или после ПЦР любым другим методом, включая, но без ограничения, лигирование ДНК или *in vitro* рекомбинацию. Поли(А) «хвосты» также обеспечивают стабильность РНК и уменьшение их деградации. Как правило, длина поли(А) «хвоста» положительно коррелирует со стабильностью транскрибированной РНК. В одном варианте осуществления поли(А) «хвост» содержит от 100 до 5000 остатков аденозина. Примеры ниже демонстрируют, что поли(А) участок длиной 100 пар нуклеотидов является достаточным для обеспечения эффективной трансляции РНК-транскрипта.

[00420] Поли(А) «хвосты» РНК могут быть дополнительно удлинены после *in vitro* транскрипции с использованием поли(А)-полимеразы, такой как полиА-полимераза *E. coli* (E-PAP). Примеры ниже демонстрируют, что увеличение длины поли(А) «хвоста» с 100 нуклеотидов до 300-400 нуклеотидов приводит к примерно двукратному увеличению эффективности трансляции РНК. Кроме того, присоединение разных химических групп к 3'-концу может приводить к повышению стабильности мРНК. Такой присоединенный фрагмент может содержать модифицированные/искусственные нуклеотиды, аптамеры и другие соединения. Например, аналоги АТФ могут быть включены в поли(А) «хвост» с использованием поли(А)-полимеразы. Аналоги АТФ также могут повышать стабильность РНК. Подходящие аналоги АТФ включают, но без ограничения, кордиоципин и 8-азааденозин.

[00421] 5'-кэпы также могут обеспечивать стабильность молекул РНК. В предпочтительном варианте осуществления РНК, полученная способами, раскрытыми в

настоящем документе, содержит 5'-кэп. 5'-кэп может, например, представлять собой $m^7G(5')ppp(5')G$, $m^7G(5')ppp(5')A$, $G(5')ppp(5')G$ или $G(5')ppp(5')A$ аналоги кэпа, все из которых коммерчески доступны. 5'-кэп также может представлять собой антиинвертированный аналог кэп-структуры (ARCA) (смотри, Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001)) или любой другой подходящий аналог. 5'-кэп вводят с использованием методов, известных в данной области и описанных в настоящем документе (Cougot, et al., Trends in Biochem. Sci., 29:436-444 (2001); Stepinski, et al., RNA, 7:1468-95 (2001); Elango, et al., Biochim. Biophys. Res. Commun., 330:958-966 (2005)).

[00422] РНК, полученная способами, раскрытыми в настоящем документе, также может содержать последовательность внутреннего участка связывания рибосомы (IRES). Последовательность IRES может представлять собой любую вирусную, хромосомную или искусственно разработанную последовательность, которая инициирует кэп-независимое связывание рибосомы с мРНК и способствует инициации трансляции. Можно добавлять любые растворенные вещества, подходящие для электропорации клеток, которые могут содержать факторы, способствующие проницаемости и жизнеспособности клеток, такие как сахара, пептиды, липиды, белки, антиоксиданты и сурфактанты.

[00423] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,25 мкМ до примерно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно

последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ/10000 ОИЛ/100 мкл среды.

с. Модификации сд-РНК

[00424] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидные средства имеют одну или более модификаций для повышения стабильности и/или эффективности терапевтического средства, а также для обеспечения эффективной доставки олигонуклеотида в клетки или ткани, подлежащие лечению. Такие модификации могут включать 2'-О-метил-модифицированный, 2'-О-фтор-модифицированный, дифосфоротиоат-модифицированный, 2'-F-модифицированный нуклеотид, 2'-О-метил-модифицированный нуклеотид и/или 2'-дезоксинуклеотид. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид модифицируют для включения одной или более гидрофобных модификаций, включая, например, стерол, холестерин, витамин D, нафтил, изобутил, бензил, индол, триптофан и/или фенил. В дополнительном конкретном варианте осуществления химически модифицированные нуклеотиды представляют собой сочетания фосфоротиоатов, 2'-О-метила, 2'-дезокса, гидрофобных модификаций и фосфоротиоатов. В некоторых вариантах осуществления могут быть модифицированы сахара, и модифицированные сахара могут включать, но не ограничиваются ими, D-рибозу, 2'-О-алкил (включая 2'-О-метил и 2'-О-этил), то есть, 2'-алкокси, 2'-амино, 2'-S-алкил, 2'-галоген (включая 2'-фтор), Т-метоксиэтокси, 2'-аллилокси (-OCH₂CH=CH₂), 2'-пропаргил, 2'-пропил, этинил, этенил, пропенил, циано и тому подобное. В одном варианте осуществления сахарный фрагмент может представлять собой гексозу и быть включен в олигонуклеотид, как описано (Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res., 18:4711 (1992)).

[00425] В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению является двухцепочечным по всей его длине, то есть, без выступающей одноцепочечной последовательности на любом конце молекулы, то есть, имеет тупые концы. В некоторых вариантах осуществления отдельные молекулы нуклеиновой кислоты могут быть разной длины. Иными словами, двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению не является двухцепочечным по всей его длине. Например, при использовании двух отдельных молекул нуклеиновой кислоты одна из молекул, например, первая молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может быть длиннее, чем вторая молекула, которая с ней гибридизуется (при этом часть молекулы остается одноцепочечной). В некоторых вариантах осуществления при использовании одной молекулы нуклеиновой кислоты часть молекулы на любом конце может оставаться одноцепочечной.

[00426] В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению содержит несовпадающие участки и/или петли или выпячивания, но является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере примерно 70% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере примерно 80% длины олигонуклеотида. В другом варианте осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере примерно 90%-95% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере примерно 96%-98% длины олигонуклеотида. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечный олигонуклеотид по изобретению имеет по меньшей мере, или вплоть до, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 несовпадений.

[00427] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотид может быть в значительной степени защищен от нуклеаз, например, за счет модификации 3' или 5'-связей (например, патент США № 5849902 и WO 98/13526). Например, олигонуклеотидам может быть придана устойчивость за счет включения «блокирующей группы». Используемый в настоящем документе термин «блокирующая группа» относится к заместителям (например, отличным от ОН-групп), которые могут быть присоединены к олигонуклеотидам или нуклеомономерам в виде либо защитных групп, либо соединительных групп для синтеза (например, FITC, пропил(CH₂-CH₂-CH₃), гликоль(-O-CH₂-CH₂-O)-фосфат (PO₃²⁻), гидрофосфонат или фосфорамидит). «Блокирующие группы» также могут включать «концевые блокирующие группы» или «блокирующие экзонуклеазу группы», которые защищают 5' и 3'-концы олигонуклеотида, в том числе модифицированные нуклеотиды и не-нуклеотидные устойчивые к экзонуклеазам структуры.

[00428] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере часть непрерывных полинуклеотидов в сд-РНК связаны замещенной связью, например, фосфоротиоатной связью.

[00429] В некоторых вариантах осуществления химическая модификация может приводить к усилению по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 раз поглощения клетками. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из остатков С или U имеет гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления множество С и U имеют гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% из С и U могут иметь гидрофобную модификацию. В некоторых вариантах осуществления все из С и U имеют гидрофобную модификацию.

[00430] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК или sd-rxRNA[®] отличаются повышенным эндосомальным высвобождением молекул sd-rxRNA[®] за счет включения протонируемых аминов. В некоторых вариантах осуществления протонируемые амины включены в смысловую цепь (в часть молекулы, которая отбрасывается после нагружения RISC). В некоторых вариантах осуществления соединения сд-РНК по изобретению представляют собой асимметричные соединения, включающие область дуплекса (необходимую для эффективного проникновения RISC, длиной 10-15 нуклеотидов) и одноцепочечную область длиной 4-12 нуклеотидов; с 13-нуклеотидным дуплексом. В некоторых вариантах осуществления используют одноцепочечную область из 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область сд-РНК содержит 2-12 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей (называемых фосфоротиоатными модификациями). В некоторых вариантах осуществления используют 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. В некоторых вариантах осуществления соединения сд-РНК по изобретению также имеют уникальный паттерн химической модификации, который обеспечивает стабильность и не препятствует проникновению RISC.

[00431] Направляющая цепь, например, также может быть модифицирована любой химической модификацией, которая придает стабильность, не препятствуя проникновению RISC. В некоторых вариантах осуществления паттерн химической модификации в направляющей цепи включает 2'-F-модификацию большинства нуклеотидов С и U, и фосфорилирование 5'-конца.

[00432] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30% нуклеотидов в сд-РНК или sd-rxRNA[®] модифицированы. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидов в сд-РНК или sd-rxRNA[®] модифицированы. В некоторых вариантах осуществления 100% нуклеотидов в сд-РНК или sd-rxRNA[®] модифицированы.

[00433] В некоторых вариантах осуществления молекулы сд-РНК имеют минимальные двухцепочечные области. В некоторых вариантах осуществления область молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину в диапазоне 8-15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления область молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления двухцепочечная область имеет длину 13 нуклеотидов. Между направляющей и пассажирской цепями может иметь место 100% комплементарность, или между направляющей и пассажирской цепями могут иметь место одно или более несовпадений. В некоторых вариантах осуществления на одном конце двухцепочечная молекула либо имеет тупой конец, либо имеет выступающую часть из одного нуклеотида.

В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область молекулы имеет длину 4-12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область может иметь длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления одноцепочечная область также может иметь длину менее 4 или более 12 нуклеотидов. В конкретных вариантах осуществления одноцепочечная область имеет длину 6 или 7 нуклеотидов.

[00434] В некоторых вариантах осуществления молекулы сд-РНК имеют повышенную стабильность. В некоторых случаях химически модифицированная молекула сд-РНК или sd-rxRNA[®] имеет период полураспада в среде, который превышает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более чем 24 часа, включая любые промежуточные значения. В некоторых вариантах осуществления sd-rxRNA[®] имеет период полураспада в среде, который превышает 12 часов.

[00435] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК оптимизирована для повышенной эффективности и/или сниженной токсичности. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная длина направляющей и/или пассажирской цепи, и/или количество фосфоротиоатных модификаций в направляющей и/или пассажирской цепи, в некоторых аспектах могут влиять на эффективность молекулы РНК, при этом замена 2'-фтор (2'F) модификаций на 2'-О-метил (2'OMe) модификации в некоторых аспектах может влиять на токсичность молекулы. В некоторых вариантах осуществления, согласно прогнозу, уменьшение содержания 2'F в молекуле приводит к уменьшению токсичности молекулы. В некоторых вариантах осуществления количество фосфоротиоатных модификаций в молекуле РНК может влиять на поглощение молекулы клеткой, например, эффективность пассивного поглощения молекулы клеткой. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК не имеют 2'F модификации, и все еще отличаются равной эффективностью в отношении поглощения клетками и проникновения в ткани.

[00436] В некоторых вариантах осуществления направляющая цепь имеет длину примерно 18-19 нуклеотидов и имеет примерно 2-14 фосфатных модификаций. Например, направляющая цепь может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, или более чем 14, нуклеотидов, которые являются фосфат-модифицированными. Направляющая цепь может содержать одну или более модификаций, которые придают повышенную стабильность, не препятствуя проникновению RISC. Фосфат-модифицированные нуклеотиды, такие как фосфоротиоат-модифицированные нуклеотиды, могут находиться на 3'-конце, 5'-конце или быть распределены по всей длине направляющей цепи. В некоторых вариантах осуществления 3'-концевые 10 нуклеотидов направляющей цепи включают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 фосфоротиоат-модифицированных нуклеотидов. Направляющая цепь также может содержать 2'F и/или 2'OMe-модификации, которые могут быть расположены по всей длине молекулы. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в положении «один» направляющей цепи (нуклеотид в самом крайнем 5'-положении направляющей цепи) является 2'OMe-модифицированным и/или фосфорилированным. Нуклеотиды С и U в направляющей цепи могут быть 2'F-

модифицированными. Например, нуклеотиды С и U в положениях 2-10 19-нт направляющей цепи (или соответствующих положениях в направляющей цепи другой длины) могут быть 2'F-модифицированными. Нуклеотиды С и U в направляющей цепи также могут быть 2'ОМе-модифицированными. Например, нуклеотиды С и U в положениях 11-18 19-нт направляющей цепи (или соответствующих положениях в направляющей цепи другой длины) могут быть 2'ОМе-модифицированными. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид в самом крайнем положении 3'-конца направляющей цепи является не модифицированным. В конкретных вариантах осуществления большинство С и U в направляющей цепи являются 2'F-модифицированными, и 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным. В других вариантах осуществления нуклеотид в положении 1, и С или U в положениях 11-18 являются 2'ОМе-модифицированными, и 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным. В других вариантах осуществления нуклеотид в положении 1, и С или U в положениях 11-18 являются 2'ОМе-модифицированными, 5'-конец направляющей цепи является фосфорилированным, и С или U в положениях 2-10 являются 2'F-модифицированными.

d. Доставка сд-РНК

[00437] Технология самодоставляемой РНКи представляет собой метод прямой трансфекции клеток средством РНКи, без необходимости в дополнительных препаратах или методах. Возможность трансфекции с трудом поддающихся трансфекции линий клеток, высокая *in vivo* активность и легкость использования являются отличительными особенностями композиций и способов, которые обладают значительными функциональными преимуществами перед традиционными методами на основе киРНК, и следовательно, методы с сд-РНК используют в некоторых вариантах осуществления в связи со способами уменьшения экспрессии гена-мишени в ОИЛ по настоящему изобретению. Методы сд-РНКи позволяют непосредственно доставлять химически синтезированные соединения в самые разные клетки и ткани, как *ex vivo*, так и *in vivo*. Сд-РНК, описанные в настоящем документе для некоторых вариантов осуществления изобретения, коммерчески доступны от компании Advirna LLC, Worcester, MA, USA.

[00438] Общая структура молекул сд-РНК показана на Фигуре 36. Молекулы сд-РНК образуются в виде гидрофобно модифицированных гибридных структур киРНК-антисмысловой олигонуклеотид и описаны, например, в публикации Burne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00439] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды сд-РНК можно доставлять в ОИЛ, описанные в настоящем документе, методом стерильной электропорации.

[00440] В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотиды можно доставлять в клетки в сочетании с системой трансмембранной доставки. В некоторых вариантах осуществления эта система трансмембранной доставки включает липиды, вирусные векторы и тому подобное. В некоторых вариантах осуществления

олигонуклеотидное средство представляет собой самодоставляемое средство РНКи, для которого не требуются никакие средства доставки.

[00441] В вариантах осуществления олигонуклеотиды, такие как РНК или сд-РНК, описанные в настоящем документе, могут быть введены в клетки-мишени с использованием различных методов, например, коммерчески доступных методов, которые включают, но без ограничения, электропорацию (Амаха Nucleofector-II (Амаха Biosystems, Cologne, Germany)), (ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, MA), систему трансфекции Neon™ (коммерчески доступную от ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) и/или Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany), опосредованную катионными липосомами трансфекцию с использованием липофекции, инкапсуляцию в полимер, опосредованную пептидами трансфекцию или системы биолистической доставки, такие как «генные пушки» (смотри, например, публикацию Nishikawa, et al. Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001), полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Смотри также патент США № 8859229, патентную заявку США № 2016/0230188, а также руководство пользователя Амаха Nucleofector® II (доступное по сетевому адресу http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/Nucleofector_Manual_II_Apr06.pdf).

[00442] В некоторых вариантах осуществления электропорацию можно выполнять с использованием Амаха NUCLEOFECTOR.TM.-II в соответствии с рекомендациями производителя. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно трансфицировать с использованием NUCLEOFECTOR.TM.-II раствора V и набора рекомендованных режимов для электропорации. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно трансфицировать с использованием растворов V, T и R и разных режимов электропорации. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно трансфицировать с использованием раствора для Т-клеток NUCLEOFECTOR.TM.-II и разных режимов электропорации. Также можно использовать альтернативные способы доставки нуклеиновых кислот для трансфицирования используемых олигонуклеотидов, описанных в настоящем документе: опосредованную катионными липосомами трансфекцию проводили с использованием липофектина или липофектамина (Invitrogen). Электропорацию также проводили с использованием ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, MA), Gene Pulser II (BioRad, Denver, CO), Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany) и/или системы трансфекции Neon™ (коммерчески доступной от компании ThermoFisher Scientific, Waltham, MA). В некоторых вариантах осуществления можно использовать ДНК плазмиды pMaxGFP (Амаха Biosystems) в качестве контроля ДНК. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансфекции (ЭТ) можно определять через примерно 3, 6, 9, 12, 15 и/или 18 часов после трансфекции методом активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS). В некоторых экспериментах трансфектанты можно дополнительно анализировать каждые 12-24 часа до того момента, когда GFP перестанет быть обнаруживаемым в контролях GFP. В некоторых вариантах

осуществления можно определять жизнеспособность клеток методом исключения красителя трипанового синего.

[00443] Олигонуклеотиды и композиции олигонуклеотидов контактируют с (например, их приводят в контакт, в настоящем документе также употребляют выражения «вводят» или «доставляют» в), и поглощаются, ОИЛ, описанными в настоящем документе, в том числе, за счет пассивного поглощения ОИЛ. Сд-РНК можно добавлять к ОИЛ, как описано в настоящем документе, во время первого размножения, например, этапа В, после первого размножения, например, во время этапа С, до или во время второго размножения, например, до или во время этапа D, после этапа D и до сбора клеток на этапе E, в течение или после сбора клеток на этапе F, до или во время окончательного формулирования и/или переноса в инфузионный мешок на этапе F, а также до любого необязательного этапа криоконсервирования на этапе F. Кроме того, сд-РНК можно добавлять после размораживания клеток после любого этапа криоконсервирования на этапе F. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в концентрациях, выбранных из группы, состоящей из диапазонов от 100 нМ до 20 мМ, от 200 нМ до 10 мМ, от 500 нМ до 1 мМ, от 1 мкМ до 100 мкМ и от 1 мкМ до 100 мкМ. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время этапов пре-ПБР или ПБР два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время первого, второго и/или дополнительных стадий размножения

два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

[00444] Композиции олигонуклеотидов по изобретению, включая сд-РНК, можно приводить в контакт с ОИЛ, описанными в настоящем документе, во время процесса размножения, например, растворяя сд-РНК в высоких концентрациях в среде для культивирования клеток и позволяя происходить пассивному поглощению клетками в течение достаточного времени. В некоторых вариантах осуществления высокие концентрации включают 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления высокие концентрации включают 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления высокие концентрации включают 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или вплоть до 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ.

[00445] В некоторых вариантах осуществления доставка олигонуклеотидов в клетки может быть усилена соответствующими известными в данной области методами, включая использование фосфата кальция, ДМСО, глицерина или декстрана, электропорации или трансфекции, например, с использованием катионных, анионных или нейтральных липидных композиций или липосом методами, известными в данной области (смотри, например, WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; патент США № 4897355; Bergan et al. 1993. *Nucleic Acids Research*. 21:3567).

е. Сочетания сд-РНК

[00446] В некоторых вариантах осуществления используют более одной сд-РНК для уменьшения экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления одну или более из нацеленных на PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH сд-РНК используют совместно. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК для PD-1 используют с одной или более из сд-РНК для TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH с целью уменьшения экспрессии более чем одного гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК для LAG3 используют в сочетании с нацеленной на CISH сд-РНК с целью уменьшения экспрессии обоих генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, нацеленные на одно или более из PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH, описанные в настоящем документе, коммерчески доступны от компании Advirna LLC, Worcester, MA, USA. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, нацеленные на одно или более из PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH, имеют структуру, показанную на Фигуре 36 или Фигуре 37.

[00447] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β 2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых

вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на PD-1, и другая сд-РНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PКА, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на ген, выбранный из PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на ген, выбранный из PD-1 и одного из LAG3, CISH, CBLB, TIM3, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на PD-1, и одна сд-РНК нацелена на LAG3. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на PD-1, и одна сд-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на PD-1, и одна сд-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на LAG3, и одна сд-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на LAG3, и одна сд-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на CISH, и одна сд-РНК нацелена на CBLB. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на TIM3, и одна сд-РНК нацелена на PD-1. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на TIM3, и одна сд-РНК нацелена на LAG3. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на TIM3, и одна сд-РНК нацелена на CISH. В некоторых вариантах осуществления одна сд-РНК нацелена на TIM3, и одна сд-РНК нацелена на CBLB.

f. Избыточная экспрессия костимулирующих рецепторов или молекул адгезии

[00448] В дополнительных вариантах осуществления изменение экспрессии белков в ОИЛ при использовании способа размножения ОИЛ также может допускать увеличение экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек в по меньшей мере части терапевтической популяции ОИЛ. Например, изменение экспрессии белков может вызывать повышение экспрессии стимулирующего рецептора, это означает, что он избыточно экспрессируется в сравнении с экспрессией стимулирующего рецептора без генетической модификации. Неограничивающие примеры генов иммунных контрольных точек, которые могут демонстрировать повышенную экспрессию в результате временного изменения экспрессии белков в ОИЛ по настоящему изобретению, включают некоторые хемокиновые рецепторы и интерлейкины, такие как CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 внутриклеточный домен (ICD) и/или NOTCH лиганд mDLL1.

(i) CCR и CCL

[00449] Чтобы адоптивная Т-клеточная иммунотерапия была эффективной, Т-клетки должны быть надлежащим образом направлены в опухоли за счет хемокинов. Соответствие между хемокинами, секретируемыми опухолевыми клетками, хемокинами, присутствующими на периферии, и хемокиновыми рецепторами, экспрессируемыми Т-клетками, является важным для успешной направленной миграции Т-клеток в ложе опухоли.

[00450] В конкретных вариантах осуществления изменение экспрессии белков

способами по настоящему изобретению может быть использовано для увеличения экспрессии определенных хемокиновых рецепторов в ОИЛ, например, одного или более из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и/или CX3CR1. Избыточная экспрессия CCR может способствовать стимуляции эффекторной функции и пролиферации ОИЛ после адоптивного переноса. В некоторых вариантах осуществления изменение экспрессии белков способами по настоящему изобретению может быть использовано для увеличения экспрессии CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22 и/или CCL17 в ОИЛ.

[00451] В конкретных вариантах осуществления экспрессия одного или более из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и/или CX3CR1 в ОИЛ усилена за счет использования композиций и способов по настоящему изобретению. Например, способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ можно осуществлять в соответствии с любым вариантом осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, способа 2А или способов, представленных на Фигурах 20 и 21), при этом способ включает редактирование генов в по меньшей мере части ОИЛ путем увеличения экспрессии одного или более из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и/или CX3CR1. Как описано более подробно ниже, процесс редактирования генов может включать использование программируемой нуклеазы, которая опосредует образование двухцепочечного или одноцепочечного разрыва в гене хемокинового рецептора. Например, можно использовать способ с применением CRISPR, способ с применением TALE или способ с применением «цинковых пальцев» для увеличения экспрессии определенных хемокиновых рецепторов в ОИЛ.

[00452] В одном из вариантов осуществления молекулы адгезии CCR4 и/или CCR5 вводят в популяцию ОИЛ с использованием гамма-ретровирусной или лентивирусной доставки, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления молекулу адгезии CXCR2 вводят в популяцию ОИЛ с использованием гамма-ретровирусной или лентивирусной доставки, как описано в публикациях Forget, et al., *Frontiers Immunology* **2017**, 8, 908 или Peng, et al., *Clin. Cancer Res.* **2010**, 16, 5458, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00453] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

- (i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента;
- (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ;
- (iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток

вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ, при этом изменение экспрессии представляет собой увеличение экспрессии одного или более из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8 и/или CCL22.

(ii) Интерлейкины и другое

[00454] В дополнительных вариантах осуществления способы редактирования генов по настоящему изобретению могут быть использованы для увеличения экспрессии определенных интерлейкинов, например, одного или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 и IL-21, а также NOTCH 1/2 внутриклеточного домена (ICD). Показано, что некоторые интерлейкины повышают эффекторные функции Т-клеток и опосредуют контролирование опухоли.

[00455] В конкретных вариантах осуществления экспрессия одного или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 и IL-21, а также NOTCH 1/2 внутриклеточного домена (ICD) в ОИЛ повышена за счет использования композиций и способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента;

(ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ;

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической

популяции ОИЛ, при этом изменение экспрессии представляет собой увеличение экспрессии одного или более из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, и IL-21, а также NOTCH 1/2 внутриклеточного домена (ICD).

IV. Способы производства ОИЛ

[00456] Иллюстративный способ получения ОИЛ, известный как способ 2А, включающий некоторые из этих признаков, представлен на Фигуре 1, и некоторые из преимуществ данного варианта осуществления настоящего изобретения над способом 1С описаны на Фигуре 2, а также Фигурах 13 и 14. Способ 1С показан для сравнения на Фигуре 3. Два альтернативных план-графика терапии при помощи ОИЛ на основе способа 2А показаны на Фигуре 4 (большее количество клеток) и Фигуре 5 (меньшее количество клеток). Вариант осуществления способа 2А показан на Фигуре 6, а также на Фигуре 8. На Фигурах 13 и 14 также представлен иллюстративный способ 2А в сравнении с иллюстративным способом 1С.

[00457] Как описано в настоящем документе, настоящее изобретение может включать этап, связанный с рестимуляцией криоконсервированных ОИЛ для повышения их метаболической активности и, следовательно, относительно здорового состояния, перед трансплантацией пациенту, и способы тестирования указанного метаболического здоровья. Как в общих чертах описано в настоящем документе, ОИЛ, как правило, получают из образца от пациента и производят определенные манипуляции для увеличения их количества перед их трансплантацией пациенту. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть, необязательно, генетически изменены, как описано ниже.

[00458] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть криоконсервированы. После размораживания они также могут быть рестимулированы для повышения их метаболизма перед инфузией пациенту.

[00459] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, называемые пре-ПБР, а также процессы, показанные на Фигуре 8 в качестве этапа А) сокращено до 3-14 дней, и второе размножение (включая процессы, называемые ПБР, а также процессы, показанные на Фигуре 8 в качестве этапа В) сокращено до 7-14 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение (например, размножение, описанное в качестве этапа В на Фигуре 8) сокращено до 11 дней, и второе размножение (например, размножение, описанное в качестве этапа D на Фигуре 8) сокращено до 11 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5, 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления сочетание первого размножения и второго размножения (например, размножения, описанного в качестве этапа В и этапа D на Фигуре 8) сокращено до 22 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах.

[00460] Приведенные ниже обозначения «этапов» А, В, С и так далее, относятся к Фигуре 8 и относятся к конкретным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок этапов, описанных ниже и на Фигуре 8, является иллюстративным, и

любое сочетание или порядок этапов, а также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов предусмотрены в настоящей заявке и в способах, раскрытых в настоящем документе.

А. ЭТАП А: Получение образца опухоли пациента

[00461] Как правило, ОИЛ исходно получают из образца опухоли пациента («первичные ОИЛ»), а затем размножают в более крупную популяцию для дальнейших манипуляций, описанных в настоящем документе, необязательно, криоконсервируют, рестимулируют, как описано в настоящем документе, и, необязательно, проводят оценку фенотипа и метаболических параметров в качестве показателя здорового состояния ОИЛ.

[00462] Образец опухоли пациента можно получать способами, известными в данной области, как правило, путем хирургической резекции, пункционной биопсии или другими способами получения образца, содержащего смесь опухолевых клеток и ОИЛ. Как правило, образец опухоли может быть из любой солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой образец жидкой опухоли, например полученный из гематологического злокачественного новообразования. Солидная опухоль может представлять собой раковую опухоль любого типа, включая, но без ограничения, рак молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, колоректальный рак, рак легкого, головного мозга, почки, желудка и кожи (включая, но без ограничения, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному и меланому). В некоторых вариантах осуществления полезные ОИЛ получают из опухолей злокачественной меланомы, например, тех, которые имеют особенно высокие уровни ОИЛ.

[00463] Термин «солидная опухоль» означает аномальную массу ткани, которая, как правило, не содержит кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «солидная злокачественная опухоль» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Злокачественные солидные опухоли включают, но без ограничения, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, рак предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака шейки матки, рака головы и шеи, включая, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), глиобластомы, рака яичника, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, трижды негативного рака молочной железы и немелкоклеточной карциномы легких. Структура ткани солидных опухолей включает взаимосвязанные тканевые компартменты, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, среди которых распределены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую микросреду.

[00464] Термин «гематологическое злокачественное новообразование» относится к формам рака и опухолям гемопоэтических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но без ограничения, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и

лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также называют «жидкими опухолями». Гематологические злокачественные новообразования включают, но без ограничения, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелколимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (ОМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМоЛ), лимфому Ходжкина и неходжскинские лимфомы. Термин «В-клеточное гематологическое злокачественное новообразование» относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, затрагивающим В-клетки.

[00465] После получения образец опухоли, как правило, фрагментируют с использованием острых инструментов на мелкие фрагменты размером от 1 до примерно 8 мм³, особенно предпочтительно, размером примерно 2-3 мм³. ОИЛ культивируют из этих фрагментов, используя ферментативные гидролизаты опухоли. Такие гидролизаты опухоли можно получать путем инкубации образцов в ферментной среде (например, буферной среде Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, содержащей 2 мМ глутамат, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы), с последующим механическим разрушением (например, с использованием гомогенизатора для тканей). Гидролизаты опухоли можно получать, помещая опухоль в ферментную среду и механически фрагментируя опухоль в течение примерно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, за которой следуют повторные циклы механического разрушения и инкубации в вышеуказанных условиях до того момента, когда будут присутствовать лишь небольшие кусочки ткани. После завершения процесса, если клеточная суспензия содержит большое число эритроцитов или мертвых клеток, можно проводить разделение в градиенте плотности разветвленного гидрофильного полисахарида фикола для удаления этих клеток. Можно использовать альтернативные способы, известные в данной области, такие как те, которые описаны в публикации патентной заявки США № 2012/0244133 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Любой из вышеуказанных способов можно использовать в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе для способов размножения ОИЛ или способов лечения рака.

[00466] Как правило, собранную клеточную суспензию называют «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00467] В некоторых вариантах осуществления фрагментирование включает физическое фрагментирование, в том числе, например, рассечение, а также расщепление. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование представляет собой физическое фрагментирование. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование представляет собой рассечение. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование представляет собой расщепление. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно изначально культивировать из ферментативных гидролизатов опухолей и опухолевых фрагментов, полученных от пациентов. В одном из вариантов осуществления ОИЛ можно изначально культивировать из ферментативных гидролизатов опухолей и опухолевых

фрагментов, полученных от пациентов.

[00468] В некоторых вариантах осуществления фрагментирование проводят до криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование проводят после криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование проводят после получения опухоли и без какого-либо криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют, и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов, или кусочков, помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют, и 30 или 40 фрагментов, или кусочков, помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления опухоль фрагментируют, и 40 фрагментов, или кусочков, помещают в каждый контейнер для первого размножения. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 мм^3 до примерно 1500 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов. В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

[00469] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ получают из опухолевых фрагментов. В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент получают путем рассечения острым инструментом. В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно от 1 мм^3 до 10 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно от 1 мм^3 до 8 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 1 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 2 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 3 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 4 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 5 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 6 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 7 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 8 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 9 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно 10 мм^3 . В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер $1\text{-}4 \text{ мм} \times 1\text{-}4 \text{ мм} \times 1\text{-}4 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер $1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм} \times 1 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер $2 \text{ мм} \times 2 \text{ мм} \times 2 \text{ мм}$. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер $3 \text{ мм} \times 3 \text{ мм} \times 3 \text{ мм}$. В

некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер 4 мм x 4 мм x 4 мм.

[00470] В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют для минимизации количества геморрагической, некротической и/или жировой тканей на каждом фрагменте. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют для минимизации количества геморрагической ткани на каждом фрагменте. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют для минимизации количества некротической ткани на каждом фрагменте. В некоторых вариантах осуществления опухоли резецируют для минимизации количества жировой ткани на каждом фрагменте.

[00471] В некоторых вариантах осуществления фрагментирование опухоли проводят с сохранением внутренней структуры опухоли. В некоторых вариантах осуществления фрагментирование опухоли проводят без выполнения распиливающих движений скальпелем. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ получают из гидролизатов опухоли. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухоли получают путем инкубации в ферментной среде, например, но без ограничения, RPMI 1640, содержащей 2 mM GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 Ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующим механическим разрушением (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). После помещения опухоли в ферментную среду опухоль можно механически фрагментировать в течение примерно 1 минуты. Затем раствор можно инкубировать в течение 30 минут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, а затем вновь механически фрагментировать в течение примерно 1 минуты. После инкубации в течение 30 минут при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ опухоль можно механически фрагментировать в третий раз в течение примерно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления, если после третьего механического разрушения все-еще присутствуют крупные куски ткани, образец можно подвергать 1 или 2 дополнительным этапам механического разрушения, используя или не используя дополнительные 30 минут инкубации при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления, если после завершения последней инкубации клеточная суспензия содержит большое число эритроцитов или мертвых клеток, можно проводить разделение в градиенте плотности фиколла для удаления этих клеток.

[00472] В некоторых вариантах осуществления собранную клеточную суспензию до проведения этапа первого размножения называют «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00473] В некоторых вариантах осуществления клетки можно, необязательно, замораживать после сбора образца и хранить замороженными до введения их в размножение, описанное на этапе В, как более подробно описано ниже, а также на Фигуре 8.

В. ЭТАП В: Первое размножение

[00474] В некоторых вариантах осуществления настоящие способы используют для получения молодых ОИЛ, которые способны на большее число циклов репликации после введения субъекту/пациенту, и, следовательно, могут обладать дополнительными

терапевтическими преимуществами перед более старыми ОИЛ (то есть, ОИЛ, которые прошли большее количество раундов репликации до введения субъекту/пациенту). Признаки 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 всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00475] Различные антигенные рецепторы Т и В-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (вариабельные), D (обеспечивающие разнообразие), J (соединительные) и C (константные), определяют специфичность связывания и последующие варианты применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение относится к способу получения ОИЛ, проявляющих повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные настоящим способом, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные настоящим способом, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные настоящим способом, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными с использованием способа, называемого способом 1С, представленным на Фигуре 13. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные в процессе первого размножения, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления повышенное разнообразие представляет собой повышенное разнообразие иммуноглобулинов и/или разнообразие Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулинов связано с тяжелой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулинов связано с легкой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с одним из Т-клеточных рецепторов, выбранным из группы, состоящей из альфа, бета, гамма и дельта рецепторов. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии TCR $\alpha\beta$ (то есть, TCR $\alpha\beta$).

[00476] После рассечения или расщепления опухолевых фрагментов, например, как описано на этапе А Фигуры 8, полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, в условиях, способствующих преимущественному росту ОИЛ, в сравнении с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухоли инкубируют в 2-мл лунках в среде, содержащей инактивированную человеческую АВ сыворотку с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение нескольких дней, как правило, 3-14 дней, что приводит к получению суммарной популяции ОИЛ, как правило, примерно 1×10^8 суммарных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода 7-14 дней, что приводит к получению суммарной популяции ОИЛ, как правило, примерно 1×10^8 суммарных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода 10-14 дней, что приводит к получению суммарной популяции ОИЛ, как правило, примерно 1×10^8 суммарных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение периода примерно 11 дней, что приводит к получению суммарной популяции ОИЛ, как правило, примерно 1×10^8 суммарных ОИЛ.

[00477] В предпочтительном варианте осуществления размножение ОИЛ можно проводить с использованием начального этапа размножения суммарных ОИЛ (например, как описано на этапе В Фигуры 8, что может включать процесс, называемый пре-ПБР), как описано ниже в настоящем документе, с последующим вторым размножением (этап D, включающий процессы, называемые этапами протокола быстрого размножения (ПБР)), как описано ниже для этапа D в настоящем документе, с последующим, необязательно, криоконсервированием, и с последующим вторым этапом D (включающим процессы, называемые этапами рестимуляции в ПБР), как описано ниже в настоящем документе. ОИЛ, полученные данным способом, могут быть, необязательно, охарактеризованы в отношении фенотипических характеристик и метаболических параметров, как описано в настоящем документе.

[00478] В вариантах осуществления, в которых культивирование ОИЛ начинают в 24-луночных планшетах, например, с использованием кластера 24-луночных плоскодонных планшетов для культивирования клеток Costar (Corning Incorporated, Corning, NY), в каждую лунку можно высевать 1×10^6 клеток гидролизата опухоли или один опухолевый фрагмент в 2 мл полной среды (СМ) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). В некоторых вариантах осуществления опухолевый фрагмент имеет размер примерно от 1 мм^3 до 10 мм^3 .

[00479] В некоторых вариантах осуществления среду для культивирования клеток, используемую для первого размножения, называют «СМ», аббревиатура для «среда для культивирования клеток». В некоторых вариантах осуществления СМ для этапа В состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, содержащей 10% человеческой АВ сыворотки, 25 мМ Непес и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, в которых культивирование начинают в газопроницаемых флаконах емкостью 40 мл с 10-см^2 газопроницаемым силиконовым

дном (например, G-REX 10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Фиг. 1), в каждый флакон вносят $10-40 \times 10^6$ жизнеспособных клеток гидролизата опухоли или 5-30 опухолевых фрагментов в 10-40 мл СМ с ИЛ-2. Как G-REX 10, так и 24-луночные планшеты инкубируют в инкубаторе с увлажненной атмосферой при 37°C и 5% CO_2 , и через 5 дней после начала культивирования половину среды удаляют и заменяют свежей средой СМ с ИЛ-2, и после дня 5 половину среды заменяют каждые 2-3 дня.

[00480] После получения опухолевых фрагментов полученные клетки (то есть, фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, способствующих преимущественному росту ОИЛ, в сравнении с опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления гидролизаты опухоли инкубируют в 2-мл лунках в среде, содержащей инактивированную человеческую АВ сыворотку (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии клеточной популяции иАПК) с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту первичную клеточную популяцию культивируют в течение нескольких дней, как правило, 10-14 дней, что приводит к получению суммарной популяции ОИЛ, как правило, примерно 1×10^8 суммарных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ростовая среда в процессе первого размножения содержит ИЛ-2, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления ИЛ представляет собой рекомбинантный человеческий ИЛ-2 (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность $20-30 \times 10^6$ МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 20×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 25×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет удельную активность 30×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию $4-8 \times 10^6$ МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию $5-7 \times 10^6$ МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор ИЛ-2 готовят, как описано в Примере 4. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 10000 МЕ/мл ИЛ-2, примерно 9000 МЕ/мл ИЛ-2, примерно 8000 МЕ/мл ИЛ-2, примерно 7000 МЕ/мл ИЛ-2, примерно 6000 МЕ/мл ИЛ-2 или примерно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 9000 МЕ/мл ИЛ-2 до примерно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 8000 МЕ/мл ИЛ-2 до примерно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 7000 МЕ/мл ИЛ-2 до примерно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. В одном из

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

[00481] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 500 МЕ/мл П-15, примерно 400 МЕ/мл П-15, примерно 300 МЕ/мл П-15, примерно 200 МЕ/мл П-15, примерно 180 МЕ/мл П-15, примерно 160 МЕ/мл П-15, примерно 140 МЕ/мл П-15, примерно 120 МЕ/мл П-15 или примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 500 МЕ/мл П-15 до примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 400 МЕ/мл П-15 до примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 300 МЕ/мл П-15 до примерно 100 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 200 МЕ/мл П-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-15. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит П-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл П-15.

[00482] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 20 МЕ/мл П-21, примерно 15 МЕ/мл П-21, примерно 12 МЕ/мл П-21, примерно 10 МЕ/мл П-21, примерно 5 МЕ/мл П-21, примерно 4 МЕ/мл П-21, примерно 3 МЕ/мл П-21, примерно 2 МЕ/мл П-21, примерно 1 МЕ/мл П-21 или примерно 0,5 МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 20 МЕ/мл П-21 до примерно 0,5 МЕ/мл П-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 15 МЕ/мл П-21 до примерно 0,5 МЕ/мл П-

21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 12 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 10 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 5 МЕ/мл IL-21 до примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл IL-21.

[00483] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл и примерно 1 мкг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитело ОКТ-3.

[00484] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбирают из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и фрагментов, производных, вариантов, биоэквивалентов, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00485] В некоторых вариантах осуществления помимо одного или более

агонистов TNFRSF среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 в начальной концентрации примерно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00486] В некоторых вариантах осуществления среду для культивирования клеток, используемую для первого размножения, называют «СМ», аббревиатура для «среда для культивирования клеток». В некоторых вариантах осуществления ее называют СМ1 (среда для культивирования клеток 1). В некоторых вариантах осуществления СМ состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, содержащей 10% человеческой АВ сыворотки, 25 мМ Нерес и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, в которых культивирование начинают в газопроницаемых флаконах емкостью 40 мл с 10-см² газопроницаемым силиконовым дном (например, G-REX 10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Фиг. 1), в каждый флакон вносят 10-40×10⁶ жизнеспособных клеток гидролизата опухоли или 5-30 опухолевых фрагментов в 10-40 мл СМ с IL-2. Как G-REX 10, так и 24-луночные планшеты инкубируют в инкубаторе с увлажненной атмосферой при 37°C и 5% CO₂, и через 5 дней после начала культивирования половину среды удаляют и заменяют свежей средой СМ с IL-2, и после дня 5 половину среды заменяют каждые 2-3 дня. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой СМ1, описанную в примерах, смотри пример 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение происходит в начальной среде для культивирования клеток, или первой среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления начальная среда для культивирования клеток, или первая среда для культивирования клеток, содержит IL-2.

[00487] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая, например, процессы, описанные на этапе В Фигуры 8, которые могут включать процессы, иногда называемые пре-ПБР) сокращено до 3-14 дней, как описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая, например, процессы, описанные на этапе В Фигуры 8, которые могут включать процессы, иногда называемые пре-ПБР) сокращено до 7-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4 и 5, а также включая, например, размножение, описанное на этапе В Фигуры 8. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе В сокращено до 10-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение сокращено до 11 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4 и 5, а также включая, например, размножение, описанное на этапе В Фигуры 8.

[00488] В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 1 дня до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 2 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое

8, как описано в настоящем документе.

[00490] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, называемые пре-ПБР; например, этап В на Фигуре 8) сокращено до 3-14 дней, как описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе В сокращено до 7-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе В сокращено до 10-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5, 6 и 7. В некоторых вариантах осуществления первое размножение сокращено до 11 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5, 6 и 7.

[00491] В некоторых вариантах осуществления первое размножение, например, этап В на Фигуре 8, проводят в биореакторе закрытого типа. В некоторых вариантах осуществления для размножения ОИЛ используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления используемый одиночный биореактор представляет собой, например, G-REX 10 или G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытого типа представляет собой одиночный биореактор.

[00492] В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять во время первого размножения, например, этапа В на Фигуре 8, в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время первого размножения, например, этапа В на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, во время первого размножения, например, этапа В на Фигуре 8, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время первого размножения,

например, этапа В на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

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

[00493] В некоторых случаях суммарную популяцию ОИЛ, полученную после первого размножения, включая, например, популяцию ОИЛ, полученную, например, на этапе В, показанном на Фигуре 8, можно немедленно криоконсервировать с использованием протоколов, описанных ниже в настоящем документе. Альтернативно, популяцию ОИЛ, полученную после первого размножения, называемую второй популяцией ОИЛ, можно подвергать второму размножению (которое может включать размножение, иногда называемое ПБР), а затем криоконсервировать, как описано ниже. Аналогично, в случае, если в терапии будут использованы генетически модифицированные ОИЛ, первая популяция ОИЛ (иногда называемая суммарной популяцией ОИЛ) или вторая популяция ОИЛ (которая в некоторых вариантах осуществления может включать популяции, называемые популяциями ПБР ОИЛ) может быть подвергнута генетической модификации, необходимой для соответствующего лечения, до размножения или после первого размножения и до второго размножения.

[00494] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после первого размножения (например, из этапа В, показанного на Фигуре 8), хранят до проведения фенотипирования для отбора. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после первого размножения (например, из этапа В, показанного на Фигуре 8), не хранят и переводят непосредственно во второе размножение. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после первого размножения, не криоконсервируют после первого размножения и до второго размножения. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через примерно 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок примерно от 3 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок примерно от 4 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок примерно от 4 дней до 10 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок примерно от 7 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через примерно 14 дней после фрагментирования.

[00495] В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней,

фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 7 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 8 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 9 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 10 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 11 дней после фрагментирования.

[00496] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ не хранят после первого размножения и до второго размножения, и ОИЛ переводят непосредственно во второе размножение (например, в некоторых вариантах осуществления не используют хранение в процессе перехода от этапа В к этапу D, как показано на Фигуре 8). В некоторых вариантах осуществления переход происходит в закрытой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после первого размножения, вторую популяцию ОИЛ, переводят непосредственно во второе размножение без переходного периода.

[00497] В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению, например, этап С на Фигуре 8, происходит в биореакторе закрытого типа. В некоторых вариантах осуществления для размножения ОИЛ используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления используемый одиночный биореактор представляет собой, например, G-REX 10 или G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытого типа представляет собой одиночный биореактор.

[00498] В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять во время перехода от первого размножения ко второму размножению, например, этапа С на Фигуре 8, в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время перехода от первого размножения ко второму размножению, например, этапа С на Фигуре 8, два раза в

день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, во время перехода от первого размножения ко второму размножению, например, этапа С на Фигуре 8, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время перехода от первого размножения ко второму размножению, например, этапа С на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

1. Цитокины

[00499] В способах размножения, описанных в настоящем документе, как правило, используют среду для культивирования с высоким содержанием цитокина, в частности, IL-2, как известно в данной области.

[00500] Альтернативно, также можно использовать сочетания цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения ОИЛ, используя сочетание двух или более из IL-2, IL-15 и IL-21, как описано в международной публикации № WO 2015/189356 и в международной публикации № WO 2015/189357, полное содержание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, возможные сочетания включают IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21, и IL-2, IL-15 и IL-21, при этом последнее сочетание особенно подходит для использования во многих вариантах осуществления. Использование сочетаний цитокинов особенно способствует получению лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, описанных в настоящем документе.

D. ЭТАП D: Второе размножение

[00501] В некоторых вариантах осуществления количество клеток в популяции ОИЛ увеличивается после сбора и начальной массовой обработки, например, после этапа А и этапа В, а также перехода, называемого этапом С, как показано на Фигуре 8. Это дополнительное размножение в настоящем документе называют вторым размножением, которое может включать процессы размножения, как правило, называемые в данной области процессом быстрого размножения (ПБР; а также процессы, показанные на этапе D Фигуры 8). Второе размножение, как правило, осуществляют с использованием среды для культивирования клеток, содержащей ряд компонентов, включая питающие клетки, источник цитокинов и анти-CD3 антитело, в газопроницаемом контейнере.

[00502] В некоторых вариантах осуществления второе размножение, или второе

размножение ОИЛ (которое может включать размножение, иногда называемое ПБР; а также процессы, показанные на этапе D Фигуры 8), можно проводить с использованием любых флаконов или контейнеров для ОИЛ, известных специалистами в данной области. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 7 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 8 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 9 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 10 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 11 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 12 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от примерно 13 дней до примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления второе размножение ОИЛ можно проводить в течение примерно 14 дней.

[00503] В одном из вариантов осуществления второе размножение можно проводить в газопроницаемом контейнере с использованием способов по настоящему изобретению (включая, например, размножение, называемое ПБР; а также процессы, показанные на этапе D Фигуры 8). Например, ОИЛ можно быстро размножать с использованием неспецифической стимуляции Т-клеточного рецептора в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). Неспецифический стимул для Т-клеточных рецепторов может включать, например, анти-CD3 антитело, например, ОКТ3, мышиное моноклональное анти-CD3 антитело (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA) или UHCT-1 (коммерчески доступное от компании BioLegend, San Diego, CA, USA) в концентрации примерно 30 нг/мл. ОИЛ можно быстро размножать путем индукции дополнительной стимуляции ОИЛ *in vitro* во время второго размножения одним или более антигенами, включая их антигенные фрагменты, такие как эпитоп(ы) раковых клеток, которые могут, необязательно, экспрессироваться с вектора, например, пептидом, связывающим человеческий лейкоцитарный антиген A2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L), или gp1 00:209-217 (210M), необязательно, в присутствии фактора роста Т-клеток, например, IL-2 или IL-15, в концентрации 300 МЕ/мл. Другие подходящие антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназу, MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2, или их антигенные фрагменты. ОИЛ также можно быстро размножать путем повторной стимуляции тем же антигеном(ами) рака на HLA-A2-экспрессирующих антигенпредставляющих клетках. Альтернативно, ОИЛ также можно повторно стимулировать, например, облученными, аутологичными лимфоцитами или облученными

HLA-A2+ аллогенными лимфоцитами и IL-2. В некоторых вариантах осуществления рестимуляция происходит во время второго размножения. В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и IL-2.

[00504] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 3000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1000 МЕ/мл, примерно 1500 МЕ/мл, примерно 2000 МЕ/мл, примерно 2500 МЕ/мл, примерно 3000 МЕ/мл, примерно 3500 МЕ/мл, примерно 4000 МЕ/мл, примерно 4500 МЕ/мл, примерно 5000 МЕ/мл, примерно 5500 МЕ/мл, примерно 6000 МЕ/мл, примерно 6500 МЕ/мл, примерно 7000 МЕ/мл, примерно 7500 МЕ/мл или примерно 8000 МЕ/мл IL-2. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или 8000 МЕ/мл IL-2.

[00505] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл и примерно 1 мкг/мл антитела ОКТ3. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитело ОКТ-3.

[00506] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит один или более агонистов TNFRSF в среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и агонист 4-1BB выбирают из группы, состоящей урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и фрагментов, производных, вариантов, биоэквивалентов, а также их сочетаний. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в среде для культивирования клеток от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00507] В некоторых вариантах осуществления помимо одного или более агонистов TNFRSF среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-2 в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл и антитело ОКТ-3 в начальной концентрации примерно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB.

[00508] В некоторых вариантах осуществления используют сочетание IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 в виде комбинации в процессе второго размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их сочетания, могут быть включены во время второго размножения, в том числе, например, во время процессов этапа D на Фигуре 8, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют сочетание IL-2, IL-15 и IL-21 в виде комбинации в процессе второго размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их сочетания, могут быть включены во время процессов этапа D на Фигуре 8, как описано в настоящем документе.

[00509] В некоторых вариантах осуществления второе размножение можно проводить в обогащенной среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3, антигенпредставляющие питающие клетки и, необязательно, агонист TNFRSF. В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в обогащенной среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления обогащенная среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие клетки (АПК; также называемые антигенпредставляющими питающими клетками). В некоторых вариантах осуществления второе размножение происходит в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие питающие клетки (то есть, антигенпредставляющие клетки).

[00510] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит примерно 500 МЕ/мл IL-15, примерно 400 МЕ/мл IL-15, примерно 300 МЕ/мл IL-15, примерно 200 МЕ/мл IL-15, примерно 180 МЕ/мл IL-15, примерно 160 МЕ/мл IL-15, примерно 140 МЕ/мл IL-15, примерно 120 МЕ/мл IL-15 или примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 500 МЕ/мл IL-15 до примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 400 МЕ/мл IL-15 до примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 300 МЕ/мл IL-15 до примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит примерно 200 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит

примерно 180 МЕ/мл IL-15. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-15. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 180 МЕ/мл IL-15.

[00511] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит примерно 20 МЕ/мл IL-21, примерно 15 МЕ/мл IL-21, примерно 12 МЕ/мл IL-21, примерно 10 МЕ/мл IL-21, примерно 5 МЕ/мл IL-21, примерно 4 МЕ/мл IL-21, примерно 3 МЕ/мл IL-21, примерно 2 МЕ/мл IL-21, примерно 1 МЕ/мл IL-21 или примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 20 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 15 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 12 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит от примерно 10 МЕ/мл IL-21 до примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит примерно от 5 МЕ/мл IL-21 до примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, содержит примерно 2 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток дополнительно содержит IL-21. В предпочтительном варианте осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 1 МЕ/мл IL-21.

[00512] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие питающие клетки (АПК) представляют собой МКПК. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и МКПК и/или антигенпредставляющих клеток на этапе быстрого размножения и/или второго размножения составляет примерно 1 к 25, примерно 1 к 50, примерно 1 к 100, примерно 1 к 125, примерно 1 к 150, примерно 1 к 175, примерно 1 к 200, примерно 1 к 225, примерно 1 к 250, примерно 1 к 275, примерно 1 к 300, примерно 1 к 325, примерно 1 к 350, примерно 1 к 375, примерно 1 к 400 или примерно 1 к 500. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и МКПК на этапе быстрого размножения и/или второго размножения составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и МКПК на этапе быстрого размножения и/или второго размножения составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00513] В одном из вариантов осуществления ПБР и/или второе размножение проводят во флаконах, при этом суммарные ОИЛ смешивают с 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл анти-CD3 антитела ОКТ3 и 3000

МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Замену среды производят (как правило, 2/3 среды заменяют путем аспирации и добавления свежей среды) до переноса клеток в альтернативную ростовую камеру. Альтернативные ростовые камеры включают флаконы G-REX и газопроницаемые контейнеры, такие как те, которые более подробно описаны ниже.

[00514] В некоторых вариантах осуществления второе размножение (которое может включать процессы, называемые ПБР) сокращено до 7-14 дней, как описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления второе размножение сокращено до 11 дней.

[00515] В одном из вариантов осуществления ПБР и/или второе размножение можно проводить с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых мешков, описанных ранее (Tran, et al., J. Immunother. **2008**, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. **2003**, 26, 332-42), или газопроницаемых емкостей для культивирования клеток (флаконов G-Rex). В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножение, называемое быстрым размножением) проводят во флаконах T-175, и примерно 1×10^6 ОИЛ, суспендированных в 150 мл среды, можно добавлять в каждый флакон T-175. ОИЛ можно культивировать в 1:1 смеси сред CM и AIM-V с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Флаконы T-175 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Половину среды можно заменять в день 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ на мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в день 7 клетки из двух флаконов T-175 можно объединять в 3-литровом мешке, и 300 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2 добавлять к 300 мл суспензии ОИЛ. Число клеток в каждом мешке можно подсчитывать каждый день или раз в два дня, и свежую среду добавлять для поддержания числа клеток на уровне $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[00516] В одном из вариантов осуществления второе размножение (которое может включать размножение, называемое ПБР, а также то, которое описано на этапе D Фигуры 8) можно проводить в газопроницаемых флаконах емкостью 500 мл с 100-см² газопроницаемым силиконовым дном (G-Rex 100, коммерчески доступны от компании Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10^6 или 10×10^6 ОИЛ можно культивировать с МКПК в 400 мл среды 50/50 с добавлением 5% человеческой АВ сыворотки, 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 (ОКТ-3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. В день 5 250 мл супернатанта можно отбирать, помещать в центрифужные стаканы и центрифугировать при 1500 об/мин (491×g) в течение 10 минут. Осадки ОИЛ можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды с 5% человеческой АВ сыворотки, 3000 МЕ/мл IL-2, и возвращать в исходные флаконы G-Rex 100. Когда ОИЛ размножают серийно во флаконах G-Rex 100, в день 7 ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 можно суспендировать в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию можно разделять на 3 100-мл аликвоты, которые можно использовать для засева 3 флаконов G-Rex 100. Затем в каждый флакон можно добавлять 150 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2. Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, и через 4 дня 150 мл

AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2 можно добавлять в каждый флакон G-Rex 100. Клетки можно собирать в день 14 культивирования.

[00517] В одном из вариантов осуществления второе размножение (включая размножение, называемое ПБР) проводят во флаконах, в которых суммарные ОИЛ смешивают с 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл анти-CD3 антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. В некоторых вариантах осуществления замену среды производят до переноса клеток в альтернативную ростовую камеру. В некоторых вариантах осуществления 2/3 среды заменяют путем аспирации и добавления свежей среды. В некоторых вариантах осуществления альтернативные ростовые камеры включают флаконы G-REX и газопроницаемые контейнеры, такие как те, которые более подробно описаны ниже.

[00518] В одном из вариантов осуществления проводят второе размножение (включая размножение, называемое ПБР), которое дополнительно включает этап, на котором ОИЛ отбирают на наличие превосходной реакционной способности в отношении опухоли. Можно использовать любой способ отбора, известный в данной области. Например, способы, описанные в публикации патентной заявки США № 2016/0010058 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, можно использовать для отбора ОИЛ на наличие превосходной реакционной способности в отношении опухоли.

[00519] Необязательно, можно проводить анализ на жизнеспособность клеток после второго размножения (включая размножение, называемое ПБР) с использованием стандартных анализов, известных в данной области. Например, для образца суммарных ОИЛ можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления в образцах ОИЛ можно проводить подсчет клеток и определять жизнеспособность с использованием автоматического счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность определяют в соответствии с протоколом визуализации при помощи автоматического счетчика клеток Cellometer K2, например, в Примере 15.

[00520] В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножение, называемое ПБР) ОИЛ можно проводить с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых мешков, описанных ранее (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342), или газопроницаемых флаконов G-Rex. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с использованием флаконов. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с использованием газопроницаемых флаконов G-Rex. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят во флаконах T-175, примерно 1×10^6 ОИЛ суспендируют в примерно 150 мл среды и добавляют суспензию в каждый флакон T-175. ОИЛ культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными МКПК в качестве «питающих» клеток

в соотношении 1 к 100, и клетки культивируют в 1:1 смеси сред CM и AIM-V (среда 50/50), с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Флаконы T-175 инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления половину среды заменяют в день 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ на мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления в день 7 клетки из 2 флаконов T-175 объединяют в 3-литровом мешке, и 300 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2 добавляют к 300 мл суспензии ОИЛ. Число клеток в каждом мешке можно подсчитывать каждый день или раз в два дня, и свежую среду добавлять для поддержания числа клеток на уровне $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[00521] В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножение, называемое ПБР) проводят во флаконах емкостью 500 мл с 100-см² газопроницаемым силиконовым дном (G-REX 100, Wilson Wolf) (Фиг. 1), примерно 5×10^6 или 10×10^6 ОИЛ культивируют с облученными аллогенными МКПК в соотношении 1 к 100 в 400 мл среды 50/50 с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Флаконы G-REX 100 инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления в день 5 250 мл супернатанта отбирают, помещают в центрифужные стаканы и центрифугируют при 1500 об/мин (491×g) в течение 10 минут. Затем осадки ОИЛ можно ресуспендировать в 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл IL-2 и возвращать в исходные флаконы G-Rex 100. В вариантах осуществления, в которых ОИЛ размножают серийно во флаконах G-Rex 100, в день 7 ОИЛ в каждом флаконе G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и клеточную суспензию разделяют на 3 100-мл аликвоты, которые используют для засеивания 3 флаконов G-Rex 100. Затем в каждый флакон добавляют 150 мл AIM-V с 5% человеческой АВ сыворотки и 3000 МЕ/мл IL-2. Флаконы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, и через 4 дня 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл IL-2 добавляют в каждый флакон G-Rex 100. Клетки собирают в день 14 культивирования.

[00522] Различные антигенные рецепторы Т и В-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (вариабельные), D (обеспечивающие разнообразие), J (соединительные) и C (константные), определяют специфичность связывания и последующие варианты применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение относится к способу получения ОИЛ, проявляющих повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные настоящим способом, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после второго размножения, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления повышенное разнообразие представляет собой повышенное разнообразие иммуноглобулинов и/или разнообразие Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулинов связано с тяжелой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления

разнообразии иммуноглобулинов связано с легкой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с одним из Т-клеточных рецепторов, выбранным из группы, состоящей из альфа, бета, гамма и дельта рецепторов. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии TCR $\alpha\beta$ (то есть, TCR $\alpha\beta$).

[00523] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для второго размножения, (например, иногда называемая CM2 или второй средой для культивирования клеток), содержит IL-2, ОКТ-3, а также антигенпредставляющие питающие клетки (АПК), как описано более подробно ниже.

[00524] В некоторых вариантах осуществления второе размножение, например, этап D на Фигуре 8, проводят в биореакторе закрытого типа. В некоторых вариантах осуществления для размножения ОИЛ используют закрытую систему, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления используемый одиночный биореактор представляет собой, например, G-REX 10 или G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытого типа представляет собой одиночный биореактор.

[00525] В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять во время второго размножения, например, этапа D на Фигуре 8, в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время второго размножения, например, этапа D на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, можно добавлять в среду для культивирования клеток, содержащую ОИЛ и другие средства, во время второго размножения, например, этапа D на Фигуре 8, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-

РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В одном из вариантов осуществления одну или более сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и SBLB, можно добавлять к культурам ОИЛ во время второго размножения, например, этапа D на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

1. Питающие клетки и антигенпредставляющие клетки

[00526] В одном из вариантов осуществления для процедуры второго размножения, описанной в настоящем документе (например, включая размножение, описанное на этапе D Фигуры 8, а также то, которое называют ПБР), необходим избыток питающих клеток в процессе ПБР размножения ОИЛ и/или во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питающие клетки представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. МКПК получают стандартными методами, такими как разделение в градиенте фиколл-пак.

[00527] Как правило, аллогенные МКПК инактивируют, либо облучением, либо нагреванием, и используют в процедурах ПБР, как описано в примерах, в которых приведен иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных МКПК.

[00528] В некоторых вариантах осуществления МКПК считают неспособными к репликации и пригодными для использования в процедурах размножения ОИЛ, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток в день 14 меньше, чем исходное количество жизнеспособных клеток, переведенных в культуру в день 0 ПБР и/или день 0 второго размножения (то есть, начальный день второго размножения).

[00529] В некоторых вариантах осуществления МКПК считают неспособными к репликации и пригодными для использования в процедурах размножения ОИЛ, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и IL-2, в день 7 и день 14 не увеличено относительно исходного количества жизнеспособных клеток, переведенных в культуру в день 0 ПБР и/или день 0 второго размножения (то есть, начальный день второго размножения). В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2.

[00530] В некоторых вариантах осуществления МКПК считают неспособными к репликации и пригодными для использования в процедурах размножения ОИЛ, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и IL-2, в день 7 и день 14 не увеличено относительно исходного количества жизнеспособных клеток, переведенных в культуру в

день 0 ПБР и/или день 0 второго размножения (то есть, начальный день второго размножения). В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела ОКТ3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела ОКТ3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2.

[00531] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие питающие клетки представляют собой МКПК. В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие питающие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие питающие клетки. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и антигенпредставляющих питающих клеток во время второго размножения составляет примерно 1 к 25, примерно 1 к 50, примерно 1 к 100, примерно 1 к 125, примерно 1 к 150, примерно 1 к 175, примерно 1 к 200, примерно 1 к 225, примерно 1 к 250, примерно 1 к 275, примерно 1 к 300, примерно 1 к 325, примерно 1 к 350, примерно 1 к 375, примерно 1 к 400 или примерно 1 к 500. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и антигенпредставляющих питающих клеток во время второго размножения составляет от 1 к 50 до 1 к 300. В одном из вариантов осуществления соотношение ОИЛ и антигенпредставляющих питающих клеток во время второго размножения составляет от 1 к 100 до 1 к 200.

[00532] В одном из вариантов осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно $2,5 \times 10^9$ питающих клеток к примерно 100×10^6 ОИЛ. В другом варианте осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно $2,5 \times 10^9$ питающих клеток к примерно 50×10^6 ОИЛ. В другом варианте осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно $2,5 \times 10^9$ питающих клеток к примерно 25×10^6 ОИЛ.

[00533] В одном из вариантов осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходим избыток питающих клеток во время второго размножения. Во многих вариантах осуществления питающие клетки представляют собой моноклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. МКПК получают стандартными методами, такими как разделение в градиенте фиколл-пак. В одном из вариантов осуществления вместо МКПК используют искусственные антигенпредставляющие клетки (иАПК).

[00534] Как правило, аллогенные МКПК инактивируют, либо облучением, либо нагреванием, и используют в процедурах размножения ОИЛ, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на Фигурах 4, 5, 6 и 7.

[00535] В одном из вариантов осуществления искусственные антигенпредставляющие клетки используют во время второго размножения вместо, или в сочетании с, МКПК.

2. Цитокины

[00536] В способах размножения, описанных в настоящем документе, как правило, используют среду для культивирования с высоким содержанием цитокина, в частности, IL-2, как известно в данной области.

[00537] Альтернативно, также можно использовать сочетания цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения ОИЛ, используя сочетание двух или более из IL-2, IL-15 и IL-21, как описано в международной публикации № WO 2015/189356 и в международной публикации № WO 2015/189357, полное содержание которых специально включено в настоящий документ посредством ссылки. Таким образом, возможные сочетания включают IL-2 и IL-15, IL-2 и IL-21, IL-15 и IL-21, и IL-2, IL-15 и IL-21, при этом последнее сочетание особенно подходит для использования во многих вариантах осуществления. Использование сочетаний цитокинов особенно способствует получению лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, описанных в настоящем документе.

Е. ЭТАП Е: Сбор ОИЛ

[00538] После этапа второго размножения клетки могут быть собраны. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов размножения, например, как показано на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают после двух этапов размножения, например, как показано на Фигуре 8.

[00539] ОИЛ можно собирать любым соответствующим методом в стерильных условиях, в том числе, например, центрифугированием. Методы сбора ОИЛ хорошо известны в данной области, и любые такие известные методы можно использовать со способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают с использованием автоматизированной системы.

[00540] Харвестеры клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны из множества источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. Любой харвестер клеток можно использовать в способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления харвестер клеток и/или система обработки клеток представляет собой мембранный харвестер клеток. В некоторых вариантах осуществления клетки собирают при помощи системы обработки клеток, такой как система LOVO (производства Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому инструменту или устройству, изготовленному любым поставщиком, способному прокачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, например, вращающуюся мембрану или вращающийся фильтр, в стерильной и/или закрытой системе, обеспечивая постоянный поток и обработку клеток, с удалением супернатанта или среды для культивирования, без

пеллетирования. В некоторых вариантах осуществления харвестер клеток и/или система обработки клеток может производить разделение, промывание, обмен жидкости, концентрирование клеток и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[00541] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток, например, этап E на Фигуре 8, производят из биореактора закрытого типа. В некоторых вариантах осуществления для размножения ОИЛ используют закрытую систему, описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления используемый одиночный биореактор представляет собой, например, G-REX 10 или G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления биореактор закрытого типа представляет собой одиночный биореактор.

[00542] В некоторых вариантах осуществления этап E на Фигуре 8 проводят способами, описанными в Примере 16. В некоторых вариантах осуществления доступ в закрытую систему обеспечивается через шприцы в стерильных условиях для поддержания стерильности и закрытого характера системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, описанную в Примере 16.

[00543] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают способами, описанными в Примере 16. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ в дни 1-11 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.5 (в Примере 16 процесс называют сбор ОИЛ в день 11). В некоторых вариантах осуществления ОИЛ в дни 12-22 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.12 (в Примере 16 процесс называют сбор ОИЛ в день 22).

F. ЭТАП F: Окончательное формулирование/перенос в инфузионный мешок

[00544] После завершения этапов A-E, представленных в иллюстративном порядке на Фигуре 8 и подробно описанных выше в настоящем документе, клетки переносят в контейнер для последующего введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления после получения терапевтически достаточного количества ОИЛ с использованием способов размножения, описанных выше, клетки переносят в контейнер для последующего введения пациенту.

[00545] В одном из вариантов осуществления ОИЛ, размноженные с использованием АПК, по настоящему изобретению вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ОИЛ в стерильном буфере. ОИЛ, размноженные с использованием МКПК, по настоящему изобретению можно вводить любым подходящим путем введения, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят в виде одной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая, предпочтительно, продолжается примерно 30-60 минут. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрелимфатический.

1. Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования

[00546] В одном из вариантов осуществления ОИЛ, размноженные с использованием способов по настоящему изобретению, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ОИЛ в стерильном буфере. ОИЛ, размноженные с использованием МКПК, по настоящему изобретению можно вводить любым подходящим путем введения, известным в данной области. В некоторых вариантах осуществления Т-клетки вводят одной внутриаартериальной или внутривенной инфузией, которая, предпочтительно, продолжается примерно 30-60 минут. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический пути введения.

[00547] Можно вводить любую подходящую дозу ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$ ОИЛ, в среднем примерно $7,8 \times 10^{10}$ ОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от примерно $1,2 \times 10^{10}$ до примерно $4,3 \times 10^{10}$ ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 3×10^{10} до примерно 12×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 4×10^{10} до примерно 10×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 5×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 6×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно 7×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет примерно $7,8 \times 10^{10}$ ОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно $1,2 \times 10^{10}$ до примерно $4,3 \times 10^{10}$ ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 3×10^{10} до примерно 12×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 4×10^{10} до примерно 10×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 5×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 6×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно 7×10^{10} до примерно 8×10^{10} ОИЛ.

[00548] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению составляет примерно 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} , 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} и 9×10^{13} . В одном из вариантов

осуществления количество ОИЛ 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} .

[00549] В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению составляет менее, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс/масс, масс/об или об/об фармацевтической композиции.

[00550] В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению составляет более 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.

[00551] В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению находится в диапазоне от примерно 0,0001% до примерно 50%, от примерно 0,001% до примерно 40%, от примерно 0,01% до примерно 30%, от примерно 0,02% до примерно 29%, от примерно 0,03% до примерно 28%, от примерно 0,04% до примерно 27%, от примерно 0,05% до примерно 26%, от примерно 0,06% до примерно 25%, от примерно 0,07% до примерно 24%, от примерно 0,08% до примерно 23%, от примерно 0,09% до примерно 22%, от примерно 0,1% до примерно 21%, от примерно 0,2% до примерно 20%, от примерно 0,3% до примерно 19%, от примерно 0,4% до примерно 18%, от примерно 0,5% до примерно 17%, от примерно 0,6% до примерно 16%, от примерно 0,7% до примерно 15%, от примерно 0,8% до примерно 14%, от примерно 0,9% до примерно 12% или от примерно 1% до примерно 10% масс/масс, масс/об или об/об фармацевтической композиции.

[00552] В некоторых вариантах осуществления концентрация ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению находится в диапазоне от примерно 0,001% до примерно 10%, от примерно 0,01% до примерно 5%, от примерно 0,02% до

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

[00553] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению равно, или менее, 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.

[00554] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ в фармацевтических композициях по изобретению превышает 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5 г, 3 г, 3,5 г, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[00555] ОИЛ, предоставленные в фармацевтических композициях по изобретению, являются эффективными в широком диапазоне доз. Точная доза будет зависеть от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, получающего лечение, массы тела субъекта, получающего лечение, а также от предпочтения и опыта лечащего врача. Принятые в клинической практике дозы ОИЛ также можно использовать, при необходимости. Количества фармацевтических композиций, вводимые с использованием способов, описанных в настоящем документе, например, дозы ОИЛ, будут зависеть от человека или другого млекопитающего, получающего лечение, степени тяжести заболевания или состояния, скорости введения, характера активных фармацевтических ингредиентов и решения лечащего врача.

[00556] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно вводить в одной дозе. Такое введение можно выполнять путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно вводить в нескольких дозах. Дозирование можно выполнять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Дозирование можно выполнять один раз в месяц, один раз каждые две недели, один раз в неделю или через день. Введение ОИЛ можно продолжать до тех пор, пока это необходимо.

[00557] В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ составляет примерно 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} .

[00558] В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ находится в диапазоне от примерно 0,01 мг/кг до примерно 4,3 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 3,6 мг/кг, от примерно 0,3 мг/кг до примерно 3,2 мг/кг, от примерно 0,35 мг/кг до примерно 2,85 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 2,85 мг/кг, от примерно 0,3 мг до примерно 2,15 мг/кг, от примерно 0,45 мг/кг до примерно 1,7 мг/кг, от примерно 0,15 мг/кг до примерно 1,3 мг/кг, от примерно 0,3 мг/кг до примерно 1,15 мг/кг, от примерно 0,45 мг/кг до примерно 1 мг/кг, от примерно 0,55 мг/кг до примерно 0,85 мг/кг, от примерно 0,65 мг/кг до примерно 0,8 мг/кг, от примерно 0,7 мг/кг до примерно 0,75 мг/кг, от примерно 0,7 мг/кг до примерно 2,15 мг/кг, от примерно 0,85 мг/кг до примерно 2 мг/кг, от примерно 1 мг/кг до примерно 1,85 мг/кг, от примерно 1,15 мг/кг до примерно 1,7 мг/кг, от примерно 1,3 мг/кг до примерно 1,6 мг/кг, от примерно 1,35 мг/кг до примерно 1,5 мг/кг, от примерно 2,15 мг/кг до примерно 3,6 мг/кг, от примерно 2,3 мг/кг до примерно 3,4 мг/кг, от примерно 2,4 мг/кг до примерно 3,3 мг/кг, от примерно 2,6 мг/кг до примерно 3,15 мг/кг, от примерно 2,7 мг/кг до примерно 3 мг/кг, от примерно 2,8 мг/кг до примерно 3 мг/кг или от примерно 2,85 мг/кг до примерно 2,95 мг/кг.

[00559] В некоторых вариантах осуществления эффективная доза ОИЛ находится в диапазоне от примерно 1 мг до примерно 500 мг, от примерно 10 мг до примерно 300 мг, от примерно 20 мг до примерно 250 мг, от примерно 25 мг до примерно 200 мг, от примерно 1 мг до примерно 50 мг, от примерно 5 мг до примерно 45 мг, от примерно 10 мг до примерно 40 мг, от примерно 15 мг до примерно 35 мг, от примерно 20 мг до примерно 30 мг, от примерно 23 мг до примерно 28 мг, от примерно 50 мг до примерно 150 мг, от примерно 60 мг до примерно 140 мг, от примерно 70 мг до примерно 130 мг, от примерно 80 мг до примерно 120 мг, от примерно 90 мг до примерно 110 мг или от примерно 95 мг до примерно 105 мг, от примерно 98 мг до примерно 102 мг, от примерно 150 мг до примерно 250 мг, от примерно 160 мг до примерно 240 мг, от примерно 170 мг до примерно 230 мг, от примерно 180 мг до примерно 220 мг, от примерно 190 мг до примерно 210 мг, от примерно 195 мг до примерно 205 мг или от примерно 198 до примерно 207 мг.

[00560] Эффективное количество ОИЛ можно вводить либо в одной, либо в нескольких дозах любым из принятых путей введения средств, имеющих аналогичные свойства, в том числе интраназальным и чрескожным путями введения,

внутриартериальной инъекцией, внутривенно, внутривнутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, топически, путем трансплантации или путем ингаляции.

Г. Необязательные компоненты клеточной среды

1. Анти-CD3 антитела

[00561] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования, используемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (включая те, которые называют ПБР, смотри, например, Фигуру А), также содержит анти-CD3 антитело. Анти-CD3 антитело в сочетании с IL-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции ОИЛ. Данный эффект можно наблюдать с полноразмерными антителами, а также с Fab и F(ab')₂ фрагментами, при этом первые, как правило, являются более предпочтительными; смотри, например, публикацию Tsoukas et al., J. Immunol. **1985**, 135, 1719, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00562] Как понятно специалистам в данной области, существует ряд подходящих антител против CD3 человека, которые можно использовать по изобретению, включая поликлональные и моноклональные антитела против CD3 человека, полученные от разных млекопитающих, включая, но без ограничения, антитела мыши, человека, примата, крысы и собаки. В конкретных вариантах осуществления используют анти-CD3 антитело ОКТ3 (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotec, Auburn, CA).

2. Агонисты 4-1BB (CD137)

[00563] В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB (CD137). Агонист 4-1BB может представлять собой любую 4-1BB-связывающую молекулу, известную в данной области. 4-1BB-связывающая молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связывать 4-1BB человека или млекопитающего. Агонисты 4-1BB, или 4-1BB-связывающие молекулы, могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Агонист 4-1BB, или 4-1BB-связывающая молекула, может иметь как тяжелые, так и легкие, цепи. Используемый в настоящем документе термин «связывающая молекула» также охватывает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела, а также фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, продуцируемые экспрессионной библиотекой Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любых из вышеперечисленных, а также генетически модифицированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связывают 4-1BB. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой полностью

человеческое антитело. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1ВВ для использования в описанных в настоящем документе способах и композициях включают анти-4-1ВВ антитела, человеческие анти-4-1ВВ антитела, мышинные анти-4-1ВВ антитела, анти-4-1ВВ антитела млекопитающих, моноклональные анти-4-1ВВ антитела, поликлональные анти-4-1ВВ антитела, химерные анти-4-1ВВ антитела, анти-4-1ВВ аднектины, анти-4-1ВВ доменные антитела, анти-4-1ВВ одноцепочечные фрагменты, анти-4-1ВВ фрагменты тяжелой цепи, анти-4-1ВВ фрагменты легкой цепи, анти-4-1ВВ слитые белки, а также их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоэквиваленты. Известно, что агонистические анти-4-1ВВ антитела индуцируют сильные иммунные ответы. Lee, et al., *PLOS One* **2013**, 8, e69677. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой агонистическое анти-4-1ВВ гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (то есть, антитело, происходящее из клеток одной линии). В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб, либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой утомилумаб или урелумаб, либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент.

[00564] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1ВВ, или 4-1ВВ-связывающая молекула, также может представлять собой слитый белок. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист 4-1ВВ, например, трехмерный или гексамерный агонист 4-1ВВ (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать превосходную кластеризацию рецепторов (4-1ВВL) и образование внутреннего клеточного сигнального комплекса в сравнении с агонистическим моноклональным антителом, которое, как правило, имеет два лиганд-связывающих домена. Трехмерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или большего порядка слитые белки, содержащие три TNFRSF-связывающих домена и IgG1-Fc, и, необязательно, другие слитые белки, связывающие две или более таких молекул, описаны, например, в Gieffers, et al., *Mol. Cancer Therapeutics* **2013**, 12, 2735-47.

[00565] Известно, что агонистические анти-4-1ВВ антитела и слитые белки индуцируют сильные иммунные ответы. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой моноклональное антитело, или слитый белок, которое связывает специфически антиген 4-1ВВ в достаточной степени для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой агонистическое анти-4-1ВВ моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC), например, NK-клеточную цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой агонистическое анти-4-1ВВ моноклональное антитело, или слитый

белок, которое устраняет антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое анти-4-1BB моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое анти-4-1BB моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет функциональную активность Fc-области.

[00566] В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB характеризуются связыванием человеческого 4-1BB (SEQ ID NO: 9) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывает человеческий 4-1BB (SEQ ID NO: 9). В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывает мышинный 4-1BB (SEQ ID NO: 10). Аминокислотные последовательности антигенов 4-1BB, которые связывает агонист 4-1BB, или связывающая молекула, приведены в Таблице 3.

ТАБЛИЦА 3. Аминокислотные последовательности антигенов 4-1BB

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 9 человеческий 4-1BB, Суперсемейства рецепторов фактор некроза опухолей, представитель 9 (Homo sapiens)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO: 10 мышинный 4-1BB, Суперсемейства рецепторов фактор некроза опухолей, представитель 9 (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TΦSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSS T HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTFL LALTSALLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[00567] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышинный 4-1BB

с величиной IC_{50} примерно 5 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB
 с величиной IC_{50} примерно 4 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB
 с величиной IC_{50} примерно 3 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный 4-1BB
 с величиной IC_{50} примерно 2 нМ или ниже, или связывает человеческий или мышинный 4-1BB
 с величиной IC_{50} примерно 1 нМ или ниже.

[00571] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб, также известный как PF-05082566 или MOR-7480, либо его фрагмент, производное, вариант или биоэквивалент. Утомилумаб доступен от компании Pfizer, Inc. Утомилумаб представляет собой иммуноглобулин G2-лямбда, направленное против TNFRSF9 Homo sapiens (суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) представителя 9, 4-1BB, Т-клеточного антигена IIA, CD137), моноклональное антитело Homo sapiens (полностью человеческое). Аминокислотные последовательности утомилумаба приведены в Таблице 4. Утомилумаб имеет сайты гликозилирования на Asn59 и Asn292; внутрицепочечные дисульфидные связи в тяжелой цепи в положениях 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) и 362-420 (C_H3); внутрицепочечные дисульфидные связи в легкой цепи в положениях 22'-87' (V_H-V_L) и 136'-195' (C_H1-C_L); межцепочечные дисульфидные связи между тяжелыми цепями в положениях 218-218, 219-219, 222-222 и 225-225 изоформы IgG2A, в положениях 218-130, 219-219, 222-222 и 225-225 изоформы IgG2A/B, и в положениях 219-130 (2), 222-222 и 225-225 изоформы IgG2B; а также межцепочечные дисульфидные связи между тяжелой и легкой цепями в положениях 130-213' (2) изоформы IgG2A, в положениях 218-213' и 130-213' изоформы IgG2A/B и в положениях 218-213' (2) изоформы IgG2B. Получение и свойства утомилумаба, а также его варианты и фрагменты описаны в патентах США №№ 8821867; 8337850 и 9468678, и публикации международной патентной заявки № WO 2012/032433 A1, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Доклинические характеристики утомилумаба описаны в Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. **2012**, 61, 1721-33. Текущие клинические испытания утомилумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают исследования, проводимые Национальными институтами здравоохранения США, clinicaltrials.gov, с регистрационными номерами NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 и NCT02554812.

[00572] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 11 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 12. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB

содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно.

[00573] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепей утомилумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой scFv антитело, содержащее области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14.

[00574] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00575] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело -агонист 4-1BB, одобренное органами,

регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога утомилумаба. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой антитело к 4-1BB, содержащее аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и имеющую одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист 4-1BB, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист 4-1BB предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или EMA в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб.

ТАБЛИЦА 4. Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1BB, относящиеся к утомилумабу

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 11 тяжелая цепь утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN Y 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG

	ALTSQVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWFYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP IIMLSDSGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO: 12 легкая цепь утомилумаба	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVLGQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
SEQ ID NO: 13 переменная область тяжелой цепи утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWGMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYVCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 14 переменная область легкой цепи утомилумаба	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO: 15 CDR1 тяжелой цепи утомилумаба	STYWIS 6
SEQ ID NO: 16 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17

тяжелой цепи утомилумаба	
SEQ ID NO: 17 CDR3 тяжелой цепи утомилумаба	RGYGIFDY 8
SEQ ID NO: 18 CDR1 легкой цепи утомилумаба	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO: 19 CDR2 легкой цепи утомилумаба	QDKNRPS 7
SEQ ID NO: 20 CDR3 легкой цепи утомилумаба	ATYTGFGSLA V 11

[00576] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело урелумаб, также известное как BMS-663513 и 20H4.9.h4a, либо его фрагмент, производное, вариант или биоэквивалент. Урелумаб доступен от компаний Bristol-Myers Squibb, Inc., и Creative Biolabs, Inc. Урелумаб представляет собой иммуноглобулин G4-каппа, направленное против TNFRSF9 Homo sapiens (суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) представителя 9, 4-1BB, Т-клеточного антигена ILA, CD137), моноклональное антитело Homo sapiens (полностью человеческое). Аминокислотные последовательности урелумаба приведены в Таблице 5. Урелумаб имеет сайты N-гликозилирования в положениях 298 (и 298''); внутрицепочечные дисульфидные связи в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_{H1}-C_L), 262-322 (C_{H2}) и 368-426 (C_{H3}) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' и 368''-426''); внутрицепочечные дисульфидные связи в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 136'-196' (C_{H1}-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 136'''-196'''); межцепочечные дисульфидные связи между тяжелыми цепями в положениях 227-227'' и 230-230''; и межцепочечные дисульфидные связи между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях 135-216' и 135''-216''''. Получение и свойства урелумаба, а также его варианты и фрагменты описаны в патентах США № 7288638 и 8962804, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Доклиническое и клинические характеристики урелумаба описаны в публикации Segal, et al., Clin. Cancer Res. **2016**,

доступной по сетевому адресу <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>. Текущие клинические испытания урелумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают исследования, проводимые Национальными институтами здравоохранения США, clinicaltrials.gov, с регистрационными номерами NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 и NCT01471210.

[00577] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 21 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 22. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно.

[00578] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепей урелумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 24, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно. В одном из вариантов

осуществления агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой scFv антитело, содержащее области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24.

[00579] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 и SEQ ID NO: 27, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29 и SEQ ID NO: 30, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00580] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист 4-1BB, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога урелумаба. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-4-1BB антитело, которое содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и имеющую одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист 4-1BB, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист 4-1BB предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или EMA в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один

или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб.

ТАБЛИЦА 5. Аминокислотные последовательности антител-агонистов 4-1ВВ, относящиеся к урелумабу

Название	Последовательность аминокислот)	(однобуквенные обозначения
SEQ ID NO: 21 тяжелая цепь урелумаба	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSGYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTVIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPKRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIIEKTISKA KGQPIBPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVL SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448	
SEQ ID NO: 22 легкая цепь урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVSYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVEFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216	
SEQ ID NO: 23 вариабельная область тяжелой цепи урелумаба	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTVISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120	

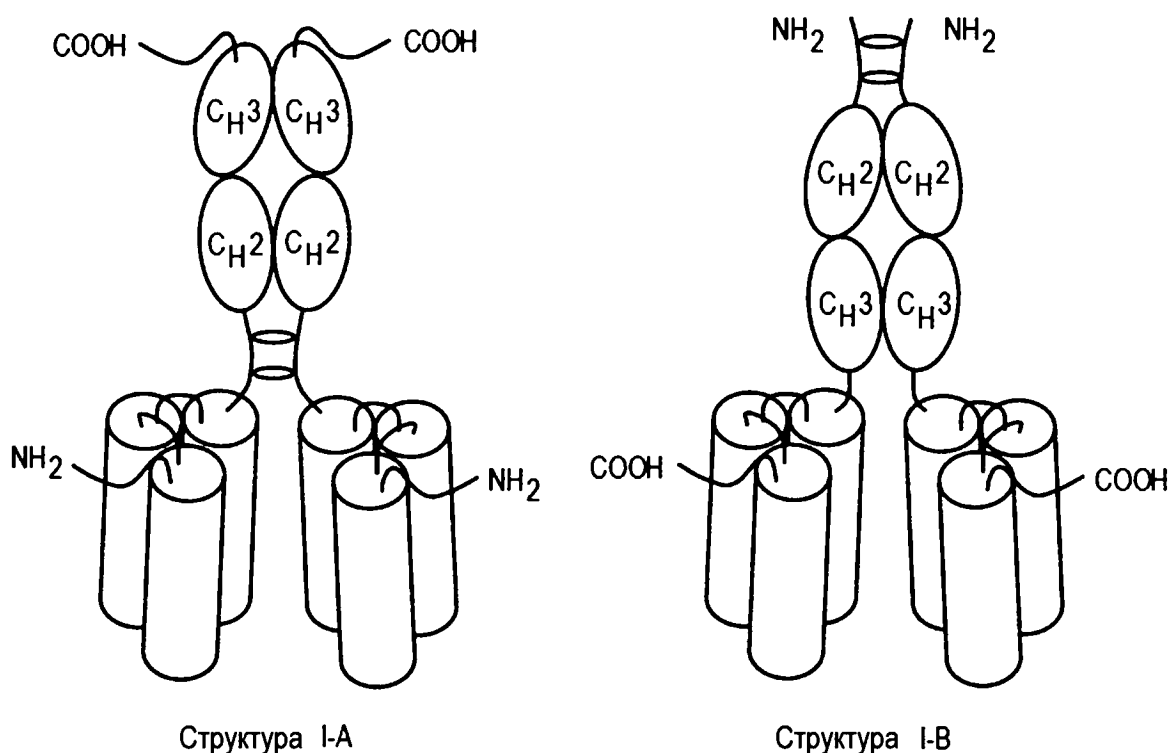
SEQ ID NO: 24 вариабельная область легкой цепи урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASN RATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSELP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO: 25 CDR1 тяжелой цепи урелумаба	GYYS 5
SEQ ID NO: 26 CDR2 тяжелой цепи урелумаба	EINHG GYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO: 27 CDR3 тяжелой цепи урелумаба	DYGP G NYDWY FDL 13
SEQ ID NO: 28 CDR1 легкой цепи урелумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 29 CDR2 легкой цепи урелумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 30 CDR3 легкой цепи урелумаба	QQRSDWPPAL T 11

[00581] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB выбирают из группы, состоящей из 1D8, 3E1or, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), ВВК2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), антитела, продуцируемого линией клеток, депонированной под ATCC № HB-11248 и описанной в патенте США № 6974863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), антител, описанных в публикации патентной заявки США № US 2005/0095244, антител,

описанных в патенте США № 7288638 (например, 20H4.9-IgG1 (BMS-663031)), антител, описанных в патенте США № 6887673 (например, 4E9 или BMS-554271), антител, описанных в патенте США № 7214493, антител, описанных в патенте США № 6303121, антител, описанных в патенте США № 6569997, антител, описанных в патенте США № 6905685 (например, 4E9 или BMS-554271), антител, описанных в патенте США № 6362325 (например, 1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3E1), антител, описанных в патенте США № 6974863 (например, 53A2); антител, описанных в патенте США № 6210669 (например, 1D8, 3B8 или 3E1), антител, описанных в патенте США № 5928893, антител, описанных в патенте США № 6303121, антител, описанных в патенте США № 6569997, антител, описанных в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2012/177788, WO 2015/119923 и WO 2010/042433, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов или биоэквивалентов, при этом содержание всех из указанных патентов или публикаций патентных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00582] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, описанный в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 и WO 2010/078966 A1; публикациях патентных заявок США №№ US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 и US 2015/0126710 A1; и патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519, и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00583] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой слитый белок-агонист 4-1BB, имеющий структуру I-A (слитый белок C-концевого Fc-фрагмента антитела) или структуру I-B (слитый белок N-концевого Fc-фрагмента антитела), либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент:



В структурах I-A и I-B цилиндры обозначают отдельные полипептидные связывающие домены. Структуры I-A и I-B включают три линейно связанных TNFRSF-связывающих домена, полученные, например, из 4-1BBL или антитела, которое связывает 4-1BB, которые сворачиваются, образуя трехвалентный белок, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc область (включающую домены C_{H3} и C_{H2}), с последующим связыванием двух трехвалентных белков вместе дисульфидными связями (небольшие удлиненные овалы), со стабилизацией структуры и образованием агонистов, способных сводить воедино внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальные белки, образуя сигнальный комплекс. TNFRSF-связывающие домены, изображенные цилиндрами, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, цепи V_H и V_L , соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости. Можно использовать любой дизайн домена scFv, например, те, которые описаны в de Marco, *Microbial Cell Factories*, **2011**, 10, 44; Ahmad, et al., *Clin. & Dev. Immunol.* **2012**, 980250; Monnier, et al., *Antibodies*, **2013**, 2, 193-208; или в литературных источниках, включенных в другие разделы настоящего документа. Структуры слитых белков такой формы описаны в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00584] Аминокислотные последовательности других полипептидных доменов структуры I-A приведены в Таблице 6. Fc-домен предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 в SEQ ID NO: 31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 в SEQ ID NO: 31) или часть шарнирного домена (например,

аминокислоты 4-16 в SEQ ID NO: 31). Предпочтительные линкеры для соединения С-концевой Fc-области антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления с последовательностями SEQ ID NO: 32 - SEQ ID NO: 41, включая линкеры, подходящие для слияния с дополнительными полипептидами.

ТАБЛИЦА 6. Аминокислотные последовательности слитых белков для TNFRSF, включая слитые белки для 4-1BB, с дизайном слитого белка с С-концевым Fc-фрагментом антитела (структура I-A).

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 31 Fc-домен	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCTVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQRPBPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV 180 LDSDGSEFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO: 32 линкер	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO: 33 линкер	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO: 34 линкер	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO: 35 линкер	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO: 36 линкер	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO: 37 линкер	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO: 38 линкер	GGPGSSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO: 39 линкер	GGPGSSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO: 40 линкер	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO: 41 линкер	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[00585] Аминокислотные последовательности других полипептидных доменов структуры I-B приведены в Таблице 7. Если Fc-фрагмент антитела слит с N-концом слитого белка для TNFRSF, как на структуре I-B, последовательность Fc-модуля предпочтительно является такой, которая представлена в SEQ ID NO: 42, и последовательности линкера предпочтительно выбирают из вариантов осуществления, последовательности которых приведены в SEQ ID NO: 43 - SEQ ID NO: 45.

ТАБЛИЦА 7. Аминокислотные последовательности слитых белков для TNFRSF, включая слитые белки для 4-1BB, с дизайном слитого белка с N-концевым Fc-фрагментом антитела (структура I-B).

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 42 Fc-домен	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQRPBPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO: 43 линкер	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO: 44 линкер	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO: 45 линкер	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[00586] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, выбранных из группы, состоящей из вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи утомилумаба, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи урелумаба, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи утомилумаба, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи, выбранных из вариabельных областей тяжелых цепей и вариabельных областей легких цепей, описанных в Таблице 8, любого сочетания вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи вышеперечисленных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоэквивалентов.

[00587] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, содержащих последовательность 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 46. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, содержащих последовательность растворимого 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 47.

[00588] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист 4-1BB со структурами I-A или I-B содержит один или более 4-1BB-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям V_H и V_L, приведенным в Таблице 8, при этом домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 8. Дополнительные полипептидные домены, полезные в качестве 4-1BB-связывающих доменов в слитых белках или в качестве scFv антител-агонистов 4-1BB.

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLV AQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO: 47 растворимый домен 4-1BBL	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
SEQ ID NO: 48 вариабельная область	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTΦ SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF

тяжелой цепи 4B4-1-1 варианта 1	TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO: 49 вариабельная область легкой цепи 4B4-1-1 варианта 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 50 вариабельная область тяжелой цепи 4B4-1-1 варианта 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTΦ SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO: 51 вариабельная область легкой цепи 4B4-1-1 варианта 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 52 вариабельная область тяжелой цепи H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTΦD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO: 53 вариабельная область легкой цепи H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00589] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистический для 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый 4-1BB-связывающий домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый 4-1BB-связывающий домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый 4-1BB-связывающий домен, также содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, и при этом дополнительный домен представляет собой домен Fab или Fc-фрагмента. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистический для 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i)

первый растворимый 4-1ВВ-связывающий домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый 4-1ВВ-связывающий домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый 4-1ВВ-связывающий домен, также содержащий дополнительный домен на N-конце и/или С-конце, при этом дополнительный домен представляет собой домен Fab или Fc-фрагмента, при этом каждый из растворимых 4-1ВВ-связывающих доменов лишен области стебля (которая участвует в образовании тримеров и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью 4-1ВВ-связывающего домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[00590] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой агонистический для 4-1ВВ одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина суперсемейства факторов некроза опухолей (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина суперсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина суперсемейства TNF, при этом каждый из растворимых доменов цитокина суперсемейства TNF лишен области стебля, и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, и при этом каждый из доменов цитокина суперсемейства TNF представляет собой 4-1ВВ-связывающий домен.

[00591] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой агонистическое для 4-1ВВ scFv антитело, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H , связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L .

[00592] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой антитело-агонист 4-1ВВ от компании BPS Bioscience, каталожный № 79097-2, коммерчески доступное от компании BPS Bioscience, San Diego, CA, USA. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1ВВ представляет собой антитело-агонист 4-1ВВ от компании Creative Biolabs, каталожный № MOM-18179, коммерчески доступное от компании Creative Biolabs, Shirley, NY, USA.

3. Агонисты OX40 (CD134)

[00593] В одном из вариантов осуществления агонист TNFRSF представляет собой агонист OX40 (CD134). Агонист OX40 может представлять собой любую OX40-связывающую молекулу, известную в данной области. OX40-связывающая молекула может представлять собой моноклональное антитело, или слитый белок, способное связывать OX40 человека или млекопитающего. Агонисты OX40, или OX40-связывающие молекулы, могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина. Агонист OX40, или OX40-связывающая молекула, может иметь как тяжелые, так и легкие цепи. Используемый в настоящем документе термин «связывающая молекула» также охватывает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела

(например, биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела, а также фрагменты антител, например, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, продуцируемые экспрессионной библиотекой Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любых из вышеперечисленных, а также генетически модифицированные формы антител, например, молекулы scFv, которые связывают OX40. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой полностью человеческое антитело. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 для использования в описанных в настоящем документе способах и композициях включают анти-OX40 антитела, человеческие анти-OX40 антитела, мышинные анти-OX40 антитела, анти-OX40 антитела млекопитающих, моноклональные анти-OX40 антитела, поликлональные анти-OX40 антитела, химерные анти-OX40 антитела, анти-OX40 аднектины, анти-OX40 доменные антитела, анти-OX40 одноцепочечные фрагменты, анти-OX40 фрагменты тяжелой цепи, анти-OX40 фрагменты легкой цепи, анти-OX40 слитые белки, а также их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоэквиваленты. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (то есть, антитело, происходящее из клеток одной линии).

[00594] В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40, или OX40-связывающая молекула, может представлять собой слитый белок. OX40-связывающие слитые белки, содержащие Fc-домен, слитый с OX40L, описаны, например, в публикации Sadun, et al., *J. Immunother.* **2009**, 182, 1481-89. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист OX40, например, трехмерный или гексамерный агонист OX40 (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать превосходную кластеризацию рецепторов (OX40L) и образование внутреннего клеточного сигнального комплекса в сравнении с агонистическим моноклональным антителом, которое, как правило, имеет два лиганд-связывающих домена. Трехмерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные), или большего порядка слитые белки, содержащие три TNFRSF-связывающих домена и IgG1-Fc, и, необязательно, другие слитые белки, связывающие две или более таких молекул, описаны, например, в Gieffers, et al., *Mol. Cancer Therapeutics* **2013**, 12, 2735-47.

[00595] Известно, что агонистические анти-OX40 антитела и слитые белки индуцируют сильные иммунные ответы. Curti, et al., *Cancer Res.* **2013**, 73, 7189-98. В предпочтительном варианте осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело, или слитый белок, которое связывает специфически антиген OX40 в достаточной степени для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет антитело-зависимую

клеточную токсичность (ADCC), например, NK-клеточную цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет комплементзависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое анти-OX40 моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет функциональную активность Fc-области.

[00596] В некоторых вариантах осуществления агонисты OX40 характеризуются связыванием человеческого OX40 (SEQ ID NO: 54) с высокой аффинностью и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывает человеческий OX40 (SEQ ID NO: 54). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывает мышинный OX40 (SEQ ID NO: 55). Аминокислотные последовательности антигенов OX40, которые связывает агонист OX40, или связывающая молекула, приведены в Таблице 9.

ТАБЛИЦА 9. Аминокислотные последовательности антигенов OX40

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 54 человеческий OX40 (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO: 55 мышинный OX40 (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSTGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTP EG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKA 240

величиной IC_{50} примерно 8 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 7 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 6 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 5 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 4 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 3 нМ или ниже, связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 2 нМ или ниже, или связывает человеческий или мышинный OX40 с величиной IC_{50} примерно 1 нМ или ниже.

[00601] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой таволиксизумаб, также известный как MEDI0562 или MEDI-0562. Таволиксизумаб доступен от MedImmune, дочерней компании AstraZeneca, Inc. Таволиксизумаб представляет собой иммуноглобулин G1-каппа, направленное против TNFRSF4 Homo sapiens (суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNFR) представителя 4, OX40, CD134) гуманизированное и химерное моноклональное антитело. Аминокислотные последовательности таволиксизумаба приведены в Таблице 10. Таволиксизумаб имеет сайты N-гликозилирования в положениях 301 и 301'', с фукозилированными двухантенными комплексными гликанами CHO-типа; внутрицепочечные дисульфидные связи в тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) и 371-429 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' и 371''-429''); внутрицепочечные дисульфидные связи в легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 134'-194' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 134'''-194'''); межцепочечные дисульфидные связи между тяжелыми цепями в положениях 230-230'' и 233-233''; и межцепочечные дисульфидные связи между тяжелой цепью и легкой цепью в положениях 224-214' и 224''-214''''. Текущие клинические испытания таволиксизумаба при различных солидных опухолях включают исследования, проводимые Национальными институтами здравоохранения США, clinicaltrials.gov, с регистрационными номерами NCT02318394 и NCT02705482.

[00602] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 56 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 57. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ

ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 56 и SEQ ID NO: 57, соответственно.

[00603] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепей таволиксизумаба. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой scFv антитело, содержащее области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59.

[00604] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61 и SEQ ID NO: 62, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, и SEQ ID NO: 65, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00605] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога таволиксизумаба. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-OX40 антитело, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность

последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и которая имеет одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист ОХ40, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом анитело-агонист ОХ40 предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. Антитело-агонист ОХ40 может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или ЕМА в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб.

ТАБЛИЦА 10. Аминокислотные последовательности антител-агонистов ОХ40, относящиеся к таволиксизумабу

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 56 тяжелая цепь таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE

	<p>PKSCDKTHTC PPCAPELLG 240</p> <p>GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN</p> <p>WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300</p> <p>NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI</p> <p>SKAKGQPIBP QVYTLPPSRE 360</p> <p>EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP</p> <p>VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR 420</p> <p>WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451</p>
<p>SEQ ID NO: 57</p> <p>легкая цепь</p> <p>таволиксизумаба</p>	<p>DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP</p> <p>GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60</p> <p>RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ</p> <p>GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120</p> <p>SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ</p> <p>ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180</p> <p>LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214</p>
<p>SEQ ID NO: 58</p> <p>вариабельная</p> <p>область тяжелой</p> <p>цепи</p> <p>таволиксизумаба</p>	<p>QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFV SGYWNWIRKH</p> <p>PGKGLYIIGY ISYNGITYHN 60</p> <p>PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY</p> <p>DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118</p>
<p>SEQ ID NO: 59</p> <p>вариабельная</p> <p>область легкой</p> <p>цепи</p> <p>таволиксизумаба</p>	<p>DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP</p> <p>GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60</p> <p>RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ</p> <p>GTKVEIKR 108</p>
<p>SEQ ID NO: 60</p> <p>CDR1 тяжелой</p> <p>цепи</p> <p>таволиксизумаба</p>	<p>GSFSSGYWN 9</p>
<p>SEQ ID NO: 61</p> <p>CDR2 тяжелой</p> <p>цепи</p> <p>таволиксизумаба</p>	<p>YIGYISYNGI TYH 13</p>
<p>SEQ ID NO: 62</p> <p>CDR3 тяжелой</p>	<p>RYKYDYDGGH AMDY 14</p>

цепи таволиксизумаба	
SEQ ID NO: 63 CDR1 легкой цепи таволиксизумаба	QDISNYLN 8
SEQ ID NO: 64 CDR2 легкой цепи таволиксизумаба	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO: 65 CDR3 легкой цепи таволиксизумаба	QQGSALPW 8

[00606] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 11D4, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от компании Pfizer, Inc. Получение и свойства 11D4 описаны в патентах США №№ 7960515; 8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 11D4 приведены в Таблице 11.

[00607] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 66 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 67. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 66 и SEQ ID NO: 67, соответственно.

[00608] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепей 11D4. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно.

[00609] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00610] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога 11D4. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-OX40 антитело, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и которая имеет одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист OX40, утвержденное, или представленное на рассмотрение для

утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист ОХ40 предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. Антитело-агонист ОХ40 может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или ЕМА в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4.

ТАБЛИЦА 11. Аминокислотные последовательности антител-агонистов ОХ40, относящиеся к 11D4

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 66 тяжелая цепь 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTФ SYSMNWVVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP ПБРQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPIMLDSGGS FFLYSKLTV D KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
SEQ ID NO: 67 легкая цепь	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60

11D4	RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO: 68 вариабельная область тяжелой цепи 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTΦ SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 69 вариабельная область легкой цепи 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO: 70 CDR1 тяжелой цепи 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO: 71 CDR2 тяжелой цепи 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO: 72 CDR3 тяжелой цепи 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO: 73 CDR1 легкой цепи 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO: 74 CDR2 легкой цепи 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO: 75 CDR3 легкой цепи 11D4	QQYNSYPPT 9

[00611] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой 18D8, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от компании Pfizer, Inc. Получение и свойства 18D8 описаны в патентах США №№ 7960515;

8236930 и 9028824, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности 18D8 приведены в Таблице 12.

[00612] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 76 и легкую цепь с последовательностью SEQ ID NO: 77. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 76 и SEQ ID NO: 77, соответственно.

[00613] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепей 18D8. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 78, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 79, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно.

[00614] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены

CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81 и SEQ ID NO: 82, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00615] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога 18D8. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-OX40 антитело, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и которая имеет одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист OX40, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист OX40 предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. Антитело-агонист OX40 может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или ЕМА в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8.

ТАБЛИЦА 12. Аминокислотные последовательности антител-агонистов OX40, относящиеся к 18D8.

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 76 тяжелая цепь 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAIKR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLV SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPIBPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPIIM LDSDGFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 77 легкая цепь 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO: 78 вариабельная область тяжелой цепи 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO: 79 вариабельная область легкой цепи 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO: 80 CDR1 тяжелой	DYAMH 5

цепи 18D8	
SEQ ID NO: 81 CDR2 тяжелой цепи 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO: 82 CDR3 тяжелой цепи 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO: 83 CDR1 легкой цепи 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO: 84 CDR2 легкой цепи 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO: 85 CDR3 легкой цепи 18D8	QQRSNWPT 8

[00616] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu119-122, которое представляет собой гуманизованное антитело, доступное от компании GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu119-122 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в международной патентной публикации № WO 2012/027328, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu119-122 приведены в Таблице 13.

[00617] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепей Hu119-122. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 86, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 87, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и

SEQ ID NO: 87, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно.

[00618] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89 и SEQ ID NO: 90, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 и SEQ ID NO: 93, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00619] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога Hu119-122. В одном из вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-OX40 антитело, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и которая имеет одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист OX40, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист OX40 предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. Антитело-агонист OX40 может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или EMA в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом

продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122.

ТАБЛИЦА 13. Аминокислотные последовательности антител-агонистов ОХ40, относящиеся к Hu119-122

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 86 вариабельная область тяжелой цепи Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS 120
SEQ ID NO: 87 вариабельная область легкой цепи Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QKPGQAPRL LIYLAASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 88 CDR1 тяжелой цепи Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO: 89 CDR2 тяжелой цепи Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO: 90 CDR3 тяжелой цепи Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO: 91 CDR1 легкой цепи Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMН 15
SEQ ID NO: 92 CDR2 легкой цепи Hu119-	LASNLES 7

122	
SEQ ID NO: 93	QHSRELPLT 9
CDR3 легкой цепи Hu119- 122	

[00620] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой Hu106-222, которое представляет собой гуманизованное антитело, доступное от компании GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu106-222 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085, и в международной патентной публикации № WO 2012/027328, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности Hu106-222 приведены в Таблице 14.

[00621] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелой и легкой цепей Hu106-222. В одном из вариантов осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 94, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 95, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 99% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 98% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 97% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 96% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно.

[00622] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 и SEQ ID NO: 98, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 и SEQ ID NO: 101, соответственно, а также их варианты с консервативными аминокислотными заменами.

[00623] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой биоэквивалентное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное органами, регулирующими оборот лекарственных средств, в качестве аналога Hu106-222. В одном из

вариантов осуществления биоэквивалентное моноклональное антитело представляет собой анти-ОХ40 антитело, содержащее аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 97% идентичность последовательности, например, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с аминокислотной последовательностью эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, и которая имеет одну или более посттрансляционных модификаций в сравнении с эталонным медицинским продуктом или эталонным биологическим продуктом, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления одну или более посттрансляционных модификаций выбирают из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и укорочения. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент представляет собой антитело-агонист ОХ40, утвержденное, или представленное на рассмотрение для утверждения, в качестве лечебного препарата, при этом антитело-агонист ОХ40 предоставлено в препарате, который отличается от препаратов эталонного медицинского продукта или эталонного биологического продукта, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222. Антитело-агонист ОХ40 может быть одобрено органами, регулирующими оборот лекарственных средств, такими как FDA в США и/или ЕМА в Европейском союзе. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления биоэквивалент предоставляют в виде композиции, которая дополнительно содержит один или более эксципиентов, при этом один или более эксципиентов являются такими же, или отличаются от эксципиентов, содержащихся в эталонном медицинском продукте или эталонном биологическом продукте, при этом эталонный медицинский продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222.

ТАБЛИЦА 14. Аминокислотные последовательности антител-агонистов ОХ40, относящиеся к Hu106-222

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 94 вариабельная область тяжелой цепи Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 95	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT TCKASQDVS TAVAWYQQKP

вариабельная область легкой цепи Hu106-222	GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 96 CDR1 тяжелой цепи Hu106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO: 97 CDR2 тяжелой цепи Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO: 98 CDR3 тяжелой цепи Hu106-222	PYYDYVSYA MDY 13
SEQ ID NO: 99 CDR1 легкой цепи Hu106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO: 100 CDR2 легкой цепи Hu106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO: 101 CDR3 легкой цепи Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00624] В некоторых вариантах осуществления антитело-агонист OX40 представляет собой MEDI6469 (также называемое 9B12). MEDI6469 представляет собой мышинное моноклональное антитело. Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой антитело, продуцируемое гибридомой 9B12, депонированной в компании Biovest Inc. (Malvern, MA, USA), описанное в публикации Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585, полное содержание которой, таким образом, включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательности CDR из MEDI6469. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи из MEDI6469.

[00625] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой L106 BD (продукт Pharmingen № 340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела L106 (продукт BD Pharmingen № 340420). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи

антитела L106 (продукт BD Pharmingen № 340420). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой АСТ35 (Santa Cruz Biotechnology, каталожный № 20073). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит CDR антитела АСТ35 (Santa Cruz Biotechnology, каталожный № 20073). В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела АСТ35 (Santa Cruz Biotechnology, каталожный № 20073). В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой мышинное моноклональное антитело анти-mCD134/mOX40 (клон OX86), коммерчески доступное от компании InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[00626] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 выбирают из агонистов OX40, описанных в публикациях международных патентных заявок №№ WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 и WO 2014/148895; Европейской патентной заявке EP 0672141; публикациях патентных заявок США №№ US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 и US 2015/132288 (включая клоны 20E5 и 12H3); и патентах США № 7504101, 7550140, 7622444, 7696175, 7960515, 7961515, 8133983, 9006399 и 9163085, содержание всех из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00627] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой слитый белок-агонист OX40, имеющий структуру I-A (слитый белок C-концевого Fc-фрагмента антитела) или структуру I-B (слитый белок N-концевого Fc-фрагмента антитела), либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент. Свойства соединений со структурами I-A и I-B описаны выше и в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Аминокислотные последовательности полипептидных доменов структуры I-A приведены в Таблице 6. Fc-домен предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 в SEQ ID NO: 31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 в SEQ ID NO: 31) или часть шарнирного домена (например, аминокислоты 4-16 в SEQ ID NO: 31). Предпочтительные линкеры для соединения C-концевого Fc-фрагмента антитела могут быть выбраны из вариантов осуществления, представленных в SEQ ID NO: 32 - SEQ ID NO: 41, включая линкеры, подходящие для слияния с дополнительными полипептидами. Аналогично, аминокислотные последовательности полипептидных доменов структуры I-B приведены в Таблице 7. Если Fc-фрагмент антитела слит с N-концом слитого белка TNRF5F, как на структуре I-B, последовательность Fc-модуля предпочтительно является такой, которая представлена в SEQ ID NO: 42, и последовательности линкера предпочтительно выбирают из вариантов осуществления, последовательности которых приведены в SEQ ID NO: 43 - SEQ ID NO: 45.

[00628] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов,

выбранных из группы, состоящей из вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи таволиксизумаба, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи 11D4, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи 18D8, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи Nu119-122, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи Nu106-222, вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи, выбранных из вариabельных областей тяжелых цепей и вариabельных областей легких цепей, приведенных в Таблице 15, любого сочетания вариabельной области тяжелой цепи и вариabельной области легкой цепи вышеперечисленных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоэквивалентов.

[00629] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, содержащих последовательность OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 102. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, содержащих последовательность растворимого OX40L. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 103. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, содержащих последовательность SEQ ID NO: 104.

[00630] В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 58 и SEQ ID NO: 59, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 68 и SEQ ID NO: 69, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере

на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 86 и SEQ ID NO: 87, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 94 и SEQ ID NO: 95, соответственно, при этом домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления слитый белок-агонист OX40 со структурами I-A или I-B содержит один или более OX40-связывающих доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям V_H и V_L , приведенным в Таблице 15, при этом домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 15. Дополнительные полипептидные домены, полезные в качестве OX40-связывающих доменов в слитых белках (например, структурах I-A или I-B) или в качестве scFv антител-агонистов OX40

Название	Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)
SEQ ID NO: 102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYSFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO: 103 растворимый домен OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYSFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO: 104 растворимый домен OX40L (альтернативный)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVT DNTSLDDFHV NGGELILIQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO: 105 вариабельная область тяжелой цепи 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTΦ NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120

SEQ ID NO: 106 вариабельная область легкой цепи 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 107 вариабельная область тяжелой цепи 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTΦ DYT MNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAЭДТА VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO: 108 вариабельная область легкой цепи 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 109 вариабельная область тяжелой цепи 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTΦ SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGLVTVS 120
SEQ ID NO: 110 вариабельная область легкой цепи 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO: 111 вариабельная область тяжелой цепи 023	EVQLVESGGG LVHPPGSLRL SCAGSGFTΦ SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFYDW GQGLVTVSS 120
SEQ ID NO: 112 вариабельная область легкой цепи 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO: 113 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO: 114 вариабельная	DIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60

область легкой цепи	RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 115 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMDHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO: 116 вариабельная область легкой цепи	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVDP 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 117 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированно го антитела	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMDHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNEE TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 118 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированно го антитела	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMDHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO: 119 вариабельная область легкой цепи гуманизированно го антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO: 120 вариабельная область легкой цепи гуманизированно го антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107

SEQ ID NO: 121 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированно го антитела	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO: 122 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированно го антитела	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGMVTVSS 120
SEQ ID NO: 123 вариабельная область легкой цепи гуманизированно го антитела	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO: 124 вариабельная область легкой цепи гуманизированно го антитела	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO: 125 вариабельная область тяжелой цепи	MYLGLNYVFI VLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTΦD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO: 126 вариабельная область легкой цепи	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKQVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHQP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00631] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой

агонистический для OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый OX40-связывающий домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый OX40-связывающий домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый OX40-связывающий домен, также содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, и при этом дополнительный домен представляет собой домен Fab или Fc-фрагмента. В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой агонистический для OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый OX40-связывающий домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый OX40-связывающий домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый OX40-связывающий домен, также содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, при этом дополнительный домен представляет собой домен Fab или Fc-фрагмента, при этом каждый из растворимых OX40-связывающих доменов лишен области стебля (которая участвует в образовании тримеров и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью OX40-связывающего домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[00632] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой агонистический для OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина суперсемейства факторов некроза опухолей (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина суперсемейства TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен цитокина суперсемейства TNF, при этом каждый из растворимых доменов цитокина суперсемейства TNF лишен области стебля, и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, и при этом домен цитокина суперсемейства TNF представляет собой OX40-связывающий домен.

[00633] В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой MEDI6383. MEDI6383 представляет собой слитый белок-агонист OX40 и может быть получен как описано в патенте США № 6312700, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

[00634] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой агонистическое для OX40 scFv антитело, содержащее любой из вышеуказанных доменов V_H , связанный с любым из вышеуказанных доменов V_L .

[00635] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело-агонист OX40 MOM-18455 от компании Creative Biolabs, коммерчески доступное от компании Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA.

[00636] В одном из вариантов осуществления агонист OX40 представляет собой антитело-агонист OX40 клона Ver-ACT35, коммерчески доступное от компании BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA.

Н. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток

[00637] Необязательно, анализ на жизнеспособность клеток можно проводить

после этапа В первого размножения, с использованием стандартных анализов, известных в данной области. Необязательно, анализ на жизнеспособность клеток можно проводить после первого размножения (иногда называемого начальным массовым размножением) с использованием стандартных анализов, известных в данной области. Например, для образца суммарных ОИЛ можно проводить анализ с трипановым синим, который избирательно метит мертвые клетки и позволяет оценивать жизнеспособность. Другие анализы для тестирования жизнеспособности могут включать, но не ограничиваются ими, анализ с аламаровым синим и анализ МТТ.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00638] В некоторых вариантах осуществления измеряют количество и/или жизнеспособность клеток. Экспрессию маркеров, таких как, но без ограничения, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, можно измерять методом проточной цитометрии с антителами, например, но без ограничения, теми, которые коммерчески доступны от компании BD Bio-sciences (BD Biosciences, San Jose, CA), с использованием проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки можно подсчитывать вручную с использованием C-chip™ одноразового гемоцитометра (VWR, Batavia, IL), и жизнеспособность можно оценивать любым методом, известным в данной области, включая, но без ограничения, окрашивание трипановым синим.

[00639] В некоторых случаях суммарную популяцию ОИЛ можно криоконсервировать немедленно, используя протоколы, описанные ниже. Альтернативно, суммарную популяцию ОИЛ можно подвергать ПБР, а затем криоконсервировать, как описано ниже. Аналогично, в случае, когда в терапии будут использованы генетически модифицированные ОИЛ, популяции суммарных или ПБР ОИЛ можно подвергать генетическим модификациям для соответствующего лечения.

2. Культуры клеток

[00640] В одном из вариантов осуществления способ размножения ОИЛ может включать использование от примерно 5000 мл до примерно 25000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 5000 мл до примерно 10000 мл среды для культивирования клеток или от примерно 5800 мл до примерно 8700 мл среды для культивирования клеток. В одном из вариантов осуществления для размножения ОИЛ используют не более одного вида среды для культивирования клеток. Можно использовать любую подходящую среду для культивирования клеток, например, среду для культивирования клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицин сульфат и 10 мкМ гентамицин сульфат) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). В этом отношении патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения ОИЛ. В одном из вариантов осуществления размножение ОИЛ может включать добавление свежей среды для культивирования клеток (также называемое подпиткой клеток) не чаще, чем каждый третий или четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает

процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

[00641] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтованной. Использование нефильтованной среды для культивирования клеток может упрощать процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанол (BME).

[00642] В одном из вариантов осуществления период времени, затрачиваемый на способ, включающий получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток; получение ОИЛ из образца опухолевой ткани; размножение ОИЛ во втором газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток, с использованием иАПК, составляет от примерно 14 до примерно 42 дней, например, примерно 28 дней.

[00643] В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры используют для размножения ОИЛ в присутствии МКПК с применением способов, композиций и устройств, известных в данной области, включая те, которые описаны в публикации патентной заявки США № 2005/0106717 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как Xuri™ Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri™ Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем, выбранный из группы, состоящей из примерно 100 мл, примерно 200 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 600 мл, примерно 700 мл, примерно 800 мл, примерно 900 мл, примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л и примерно 10 л.

[00644] В одном из вариантов осуществления ОИЛ можно размножать во флаконах G-Rex (коммерчески доступных от компании Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют популяциям клеток размножаться от уровня примерно 5×10^5 клеток/см² до уровня 10×10^6 - 30×10^6 клеток/см². В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без добавления к клеткам свежей среды для культивирования клеток (также называемого подпиткой клеток). В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без подпитки, пока среда остается на высоте примерно 10 см во

флаконе G-Rex. В одном из вариантов осуществления размножение происходит без подпитки, но при добавлении одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления цитокин можно добавлять в виде болюса, без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области и были использованы для размножения ОИЛ, они включают те, которые описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0377739 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2014/210036 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации патентной заявки США № US 2011/0136228 A1, патенте США № US 8809050 B2, публикации международной патентной заявки № WO 2011/072088 A2, публикации патентной заявки США № US 2016/0208216 A1, публикации патентной заявки США № US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2012/129201 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0102075 A1, патенте США № 8956860, публикации международной патентной заявки № WO 2013/173835 A1 и публикации патентной заявки США № US 2015/0175966 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие способы также описаны в публикации Jin, et al., *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283-292.

I. Необязательная генетическая модификация ОИЛ

[00645] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, необязательно, генетически модифицируют для включения дополнительных функциональных свойств, в том числе, но без ограничения, высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), например, TCR, нацеленного на опухоль-ассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерного антигенного рецептора (CAR), который связывается с опухоль-ассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или связанной с линией дифференцировки молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

J. Необязательное криоконсервирование ОИЛ

[00646] Как описано выше, и приведено в качестве примера на этапах А-Е Фигуры 8, криоконсервирование можно производить в самые разные моменты времени на всем протяжении процесса размножения ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать размноженную популяцию ОИЛ после второго размножения (как показано, например, для этапа D Фигуры 8). Криоконсервирование, как правило, можно выполнять, помещая популяцию ОИЛ в раствор для замораживания, например, содержащий 85% АВ сыворотки с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C, с переносом, необязательно, в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. Смотри Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют в среде для культивирования клеток плюс 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ

криоконсервируют способами, описанными в примерах 8 и 9.

[00647] При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет разморожено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и, необязательно, промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ОИЛ можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области.

К. Способы определения фенотипических характеристик размноженных ОИЛ

[00648] Продуцирование гранзима В: гранзим В является другой мерой способности ОИЛ уничтожать клетки-мишени. Супернатанты клеток, рестимулированных, как описано выше, с использованием антитела к CD3, CD28 и CD137/4-1BB, также оценивали на уровни в них гранзима В с использованием набора Human Granzyme B DuoSet ELISA Kit (R & D Systems, Minneapolis, MN) в соответствии с инструкциями производителя. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 8, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) демонстрируют повышенное продуцирование гранзима В.

[00649] В некоторых вариантах осуществления длину теломер можно использовать в качестве меры жизнеспособности клеток и/или клеточной функции. В некоторых вариантах осуществления теломеры, на удивление, имеют такую же длину в ОИЛ, полученных способами по настоящему изобретению, в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными от тех, которые представлены на Фигуре 8. Измерение длины теломер: были использованы различные способы для измерения длины теломер в геномной ДНК и цитологических препаратах. Анализ рестрикционных фрагментов теломер (TRF) является золотым стандартом измерения длины теломер (de Lange et al., 1990). Однако основным ограничением анализа TRF является необходимость большого количества ДНК (1,5 мкг). Два широко используемых метода измерения длины теломер, а именно, флуоресценцию при *in situ* гибридизации (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) и количественную ПЦР, можно использовать с настоящим изобретением.

[00650] В некоторых вариантах осуществления здоровое состояние ОИЛ определяют на основании секреции IFN-гамма (IFN- γ). В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ является признаком активных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления используют анализ на продуцирование IFN- γ . Продуцирование IFN- γ является другой мерой цитотоксического потенциала. Продуцирование IFN- γ можно измерять путем определения уровней цитокина IFN- γ в среде от ОИЛ, стимулированных антителами к CD3, CD28 и CD137/4-1BB. Уровни IFN- γ в среде от этих стимулированных ОИЛ можно определять путем измерения секреции IFN- γ .

[00651] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический потенциал ОИЛ для лизиса клеток-мишеней оценивают с использованием анализа с совместным

культивированием ОИЛ и биолюминесцентной линии клеток, P815 (клон G6), в формате биолюминесцентного анализа перенаправленного лизиса (анализ активности) для ОИЛ, который позволяет измерять цитотоксичность ОИЛ высокочувствительным зависимым от дозы образом.

[00652] В некоторых вариантах осуществления в настоящих способах предложен анализ для оценки жизнеспособности ОИЛ с использованием методов, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ размножают, как описано выше, в том числе, например, как представлено на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют перед проведением оценки на жизнеспособность. В некоторых вариантах осуществления оценка жизнеспособности включает размораживание ОИЛ перед проведением первого размножения, второго размножения и дополнительного второго размножения. В некоторых вариантах осуществления в настоящих способах предложен анализ для оценки клеточной пролиферации, клеточной токсичности, клеточной гибели и/или других показателей, связанных с жизнеспособностью популяции ОИЛ. Жизнеспособность можно измерять при помощи любого из анализов метаболизма ОИЛ, описанных выше, а также любыми методами оценки жизнеспособности клеток, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления в настоящих способах предложен анализ для оценки клеточной пролиферации, клеточной токсичности, клеточной гибели и/или других показателей, связанных с жизнеспособностью ОИЛ, размноженных с использованием способов, описанных в настоящем документе, включая те, которые представлены на Фигуре 8.

[00653] Настоящее изобретение также относится к аналитическим методам для определения жизнеспособности ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ имеют равнозначную жизнеспособность в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными от тех, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ имеют повышенную жизнеспособность в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными от тех, которые представлены на Фигуре 8. По настоящему изобретению предложены методы анализа ОИЛ на жизнеспособность при размножении опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в более крупную популяцию ОИЛ, включающем:

- (i) получение первой популяции ОИЛ, которая была ранее размножена;
- (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ; и
- (iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток

вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, и при этом третью популяцию ОИЛ дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[00654] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает:

(iv) проведение дополнительного второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции ОИЛ дополнительного П-2, дополнительного ОКТ-3 и дополнительных АПК, при этом дополнительное второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения большей популяции ОИЛ, чем популяция, полученная на этапе (iii), и при этом третью популяцию дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[00655] В некоторых вариантах осуществления перед этапом (i) клетки криоконсервируют.

[00656] В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают перед проведением этапа (i).

[00657] В некоторых вариантах осуществления этап (iv) повторяют от одного до четырех раз с целью получения достаточного количества ОИЛ для анализа.

[00658] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 40 дней до примерно 50 дней.

[00659] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 48 дней.

[00660] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 45 дней.

[00661] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение примерно 44 дней.

[00662] В некоторых вариантах осуществления клетки, полученные на этапах (iii) или (iv), экспрессируют CD4, CD8 и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных уровням свежесобранных клеток.

[00663] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[00664] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-17 на этапе (iii).

[00665] В некоторых вариантах осуществления АПК представляют собой искусственные АПК (иАПК).

[00666] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00667] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00668] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим

нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, слитый с по меньшей мере одним эндодоменом Т-клеточной сигнальной молекулы.

[00669] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00670] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность.

[00671] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования.

[00672] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования и после этапа (iv).

[00673] Различные антигенные рецепторы Т и В-лимфоцитов образуются в результате соматической рекомбинации ограниченного, но большого числа генных сегментов. Эти генные сегменты: V (переменные), D (обеспечивающие разнообразие), J (соединительные) и C (константные), определяют специфичность связывания и последующие варианты применения иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Настоящее изобретение относится к способу получения ОИЛ, проявляющих повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара (иногда называемое поликлональностью). В некоторых вариантах осуществления разнообразие Т-клеточного репертуара является повышенным в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными от тех, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные настоящим способом, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные при первом размножении, проявляют повышенное разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления повышенное разнообразие представляет собой повышенное разнообразие иммуноглобулинов и/или разнообразие Т-клеточных рецепторов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулинов связано с тяжелой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие иммуноглобулинов связано с легкой цепью иммуноглобулинов. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с Т-клеточным рецептором. В некоторых вариантах осуществления разнообразие связано с одним из Т-клеточных рецепторов, выбранным из группы, состоящей из альфа, бета, гамма и дельта рецепторов. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. В некоторых вариантах осуществления имеет место увеличение экспрессии TCR $\alpha\beta$ (то есть, TCR $\alpha\beta$).

[00674] По настоящему изобретению предложен способ анализа ОИЛ на

жизнеспособность и/или возможность последующего введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления способ анализа опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) включает:

- (i) получение первой популяции ОИЛ;
- (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ; и
- (iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ;
- (iv) сбор, промывание и криоконсервирование третьей популяции ОИЛ;
- (v) хранение криоконсервированных ОИЛ при криогенной температуре;
- (vi) размораживание третьей популяции ОИЛ, с получением размороженной третьей популяции ОИЛ; и
- (vii) проведение дополнительного второго размножения части размороженной третьей популяции ОИЛ путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции IL-2, ОКТ-3 и АПК в течение дополнительного периода размножения (иногда называемого периодом ре-ПБР) продолжительностью по меньшей мере 3 дня, при этом проводят третье размножение, с получением четвертой популяции ОИЛ, при этом количество ОИЛ в четвертой популяции ОИЛ сравнивают с количеством ОИЛ в третьей популяции ОИЛ для получения соотношения;
- (viii) определение на основании соотношения, полученного на этапе (vii), подходит ли размороженная популяция ОИЛ для введения пациенту;
- (ix) введение терапевтически эффективной дозы размороженной третьей популяции ОИЛ пациенту, если соотношение количества ОИЛ в четвертой популяции ОИЛ и количества ОИЛ в третьей популяции ОИЛ при определении превышает 5:1 на этапе (viii).

[00675] В некоторых вариантах осуществления дополнительный период размножения (иногда называемый периодом ре-ПБР) проводят до того момента, когда соотношение количества ОИЛ в четвертой популяции ОИЛ и количества ОИЛ в третьей популяции ОИЛ превышает 50:1.

[00676] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$.

[00677] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (vii) проводят в течение периода времени от примерно 40 дней до примерно 50 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (vii) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 48 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (vii) проводят в

течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 45 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (vii) проводят в течение примерно 44 дней.

[00678] В некоторых вариантах осуществления клетки на этапах (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8, и TCR $\alpha\beta$ на уровнях, аналогичных уровням в свежесобранных клетках. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой ОИЛ.

[00679] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-17 на этапе (iii).

[00680] В некоторых вариантах осуществления АПК представляют собой искусственные АПК (иАПК).

[00681] В некоторых вариантах осуществления проводят этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00682] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00683] В некоторых вариантах осуществления проводят этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий одноцепочечный переменный фрагмент антитела, слитый с по меньшей мере одним эндодоменом Т-клеточной сигнальной молекулы.

[00684] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00685] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после этапа (vii).

[00686] По настоящему изобретению также предложены дополнительные способы анализа ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления по изобретению предложен способ анализа ОИЛ, включающий:

- (i) получение части первой популяции криоконсервированных ОИЛ;
- (ii) размораживание части первой популяции криоконсервированных ОИЛ;
- (iii) проведение первого размножения путем культивирования части первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие клетки (АПК), в течение дополнительного периода размножения (иногда называемого периодом ре-ПБР) продолжительностью по меньшей мере 3 дня, с получением второй популяции ОИЛ, при этом часть первой популяции ОИЛ сравнивают со второй популяцией ОИЛ для получения соотношения количеств ОИЛ, при этом соотношение количества ОИЛ во второй популяции ОИЛ и количества ОИЛ в части первой популяции ОИЛ превышает 5:1;
- (iv) определение на основании соотношения, полученного на этапе (iii), подходит ли первая популяция ОИЛ для терапевтического введения пациенту;

(v) определение, что первая популяция ОИЛ подходит для терапевтического введения, если соотношение количества ОИЛ во второй популяции ОИЛ и количества ОИЛ в первой популяции ОИЛ при определении превышает 5:1 на этапе (iv).

[00687] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества ОИЛ во второй популяции ОИЛ и количества ОИЛ в части первой популяции ОИЛ превышает 50:1.

[00688] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение размножения всей первой популяции криоконсервированных ОИЛ из этапа (i) способами, описанными в любом из вариантов осуществления, предложенных в настоящем документе.

[00689] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение всей первой популяции криоконсервированных ОИЛ из этапа (i) пациенту.

L. Закрытые системы для производства ОИЛ

[00690] Настоящее изобретение относится к использованию закрытых систем в процессе культивирования ОИЛ. Такие закрытые системы позволяют предотвращать и/или уменьшать микробное загрязнение, позволяют использовать меньшее количество флаконов и позволяют снижать затраты. В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используют два контейнера.

[00691] Такие закрытые системы хорошо известны в данной области, и их описание можно найти, например, на сайтах <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> и <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>.

[00692] В некоторых вариантах осуществления закрытые системы включают крепление Люэра и герметизированные термосваркой системы, описанные, например, в Примере 16. В некоторых вариантах осуществления доступ в закрытую систему обеспечивается через шприцы в стерильных условиях для поддержания стерильности и закрытого характера системы. В некоторых вариантах осуществления используют закрытую систему, описанную в Примере 16. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ формулируют в конечный препарат в контейнере способом, описанным в Примере 16, раздел 8.14 «Окончательное формулирование и фасовка».

[00693] Как указано на вебсайте FDA, закрытые системы и способы стерильного культивирования известны и подробно описаны. Смори <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, выше, и описание соответствующей части ниже.

Введение

[00694] Стерильные соединительные устройства (STCD) создают стерильные сварные швы между двумя частями совместимых труб. Эта процедура позволяет стерильно соединять контейнеры и трубы разного диаметра. В данном руководстве описаны рекомендуемые методы и процедуры для использования этих устройств. Данное руководство не касается информации о данных, которые производитель стерильного

соединительного устройства должен представить в FDA для получения одобрения или разрешения на продажу. Важно также отметить, что использование одобренного или разрешенного для продажи стерильного соединительного устройства для целей, не указанных в информационном листке, может приводить к тому, что устройство будет считаться фальсифицированным и неправильно маркированным в соответствии с Федеральным Законом о пищевых продуктах, лекарственных средствах и парфюмерно-косметических товарах.

[00695] В некоторых вариантах осуществления в закрытой системе используют один контейнер с момента получения опухолевых фрагментов до того момента, когда ОИЛ готовы для введения пациенту или криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, когда используют два контейнера, первый контейнер представляет собой закрытый G-контейнер, и популяцию ОИЛ центрифугируют и переносят в инфузионный мешок без открывания первого закрытого G-контейнера. В некоторых вариантах осуществления, когда используют два контейнера, инфузионный мешок представляет собой НураThermosol-содержащий инфузионный мешок. Закрытая система, или закрытая система для культивирования ОИЛ, характеризуется тем, что после добавления образца опухоли и/или опухолевых фрагментов система является герметично закрытой снаружи, образуя замкнутую среду, свободную от вторжения бактерий, грибков и/или любых других микробных загрязнений.

[00696] В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от примерно 5% до примерно 100%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от примерно 5% до примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от примерно 5% до примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от примерно 10% до примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет от примерно 15% до примерно 85%. В некоторых вариантах осуществления степень уменьшения микробного загрязнения составляет примерно 5%, примерно 10%, примерно 15%, примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100%.

[00697] Закрытая система позволяет ОИЛ расти в отсутствие и/или при значительной степени уменьшения микробного загрязнения.

[00698] Кроме того, pH, парциальное давление диоксида углерода и кислорода в среде культивирования ОИЛ варьируются в процессе культивирования клеток. Следовательно, даже несмотря на циркуляцию среды, подходящей для культивирования клеток, среду в закрытой системе все-еще необходимо постоянно поддерживать в оптимальном состоянии для пролиферации ОИЛ. Для этого желательно контролировать

физические факторы рН, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода в культуральной жидкости закрытой системы при помощи датчика, сигнала, который используют для управления газообменником, установленным на входе в систему культивирования, для корректировки в реальном времени парциального давления газа в закрытой системе в соответствии с изменениями в культуральной жидкости, с тем, чтобы оптимизировать среду для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к закрытой системе для культивирования клеток, имеющей на входе в закрытую систему газообменник, оборудованный контрольным устройством, которое измеряет рН, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода закрытой системы и оптимизирует среду для культивирования клеток путем автоматической корректировки концентраций газов на основании сигналов контрольного устройства.

[00699] В некоторых вариантах осуществления давление в закрытой системе постоянно или периодически контролируется. То есть, давление в закрытой системе можно варьировать с помощью устройства поддержания давления, например, таким образом обеспечивая пригодность пространства для роста ОИЛ в условиях положительного давления или стимулируя экссудацию жидкости в условиях отрицательного давления и, таким образом, стимулируя пролиферацию клеток. Кроме того, путем периодического применения отрицательного давления можно однородно и эффективно заменять циркулирующую жидкость в закрытой системе за счет временного уменьшения объема закрытого пространства.

[00700] В некоторых вариантах осуществления оптимальные культуральные компоненты, необходимые для пролиферации ОИЛ, можно заменять или добавлять, в том числе, можно добавлять такие факторы, как IL-2 и/или ОКТЗ, а также их сочетание.

С. Культуры клеток

[00701] В одном из вариантов осуществления способ размножения ОИЛ, включая те, которые описаны выше, а также представлены на Фигуре 8, может включать использование от примерно 5000 мл до примерно 25000 мл среды для культивирования клеток, от примерно 5000 мл до примерно 10000 мл среды для культивирования клеток или от примерно 5800 мл до примерно 8700 мл среды для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления среда представляет собой бессывороточную среду, описанную, например, в Примере 21. В некоторых вариантах осуществления среда при первом размножении не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления среда при втором размножении не содержит сыворотку. В некоторых вариантах осуществления как среда при первом размножении, так и среда при втором размножении, не содержит сыворотку. В одном из вариантов осуществления для размножения ОИЛ используют не более одного вида среды для культивирования клеток. Можно использовать любую подходящую среду для культивирования клеток, например, среду для культивирования клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицин сульфат и 10 мкМ гентамицин сульфат) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). В этом отношении

патентуемые способы обладают преимуществом уменьшения количества среды, а также числа видов сред, необходимых для размножения ОИЛ. В одном из вариантов осуществления размножение ОИЛ может включать подпитку клеток не чаще, чем каждый третий или четвертый день. Размножение клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения клеток, за счет уменьшения частоты подпитки, необходимой для размножения клеток.

[00702] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтованной. Использование нефильтованной среды для культивирования клеток может упрощать процедуры, необходимые для размножения клеток. В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанол (BME).

[00703] В одном из вариантов осуществления период времени, затрачиваемый на способ, включающий получение образца опухолевой ткани от млекопитающего; культивирование образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток; получение ОИЛ из образца опухолевой ткани; размножение ОИЛ во втором газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток, составляет примерно 7-14 дней, например, примерно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления пре-ПБР занимает примерно 7-14 дней, например, примерно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления ПБР занимает примерно 7-14 дней, например, примерно 11 дней.

[00704] В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры используют для размножения ОИЛ в присутствии МКПК с применением способов, композиций и устройств, известных в данной области, включая те, которые описаны в публикации патентной заявки США № 2005/0106717 А1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках. В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как Xuri™ Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления ОИЛ размножают с использованием системы размножения клеток, в которой ОИЛ размножают в газопроницаемых мешках, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri™ Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления система размножения клеток включает газопроницаемый мешок для клеток, имеющий объем, выбранный из группы, состоящей из примерно 100 мл, примерно 200 мл, примерно 300 мл, примерно 400 мл, примерно 500 мл, примерно 600 мл, примерно 700 мл, примерно 800 мл, примерно 900 мл, примерно 1 л, примерно 2 л, примерно 3 л, примерно 4 л, примерно 5 л, примерно 6 л, примерно 7 л, примерно 8 л, примерно 9 л и примерно 10 л.

[00705] В одном из вариантов осуществления ОИЛ можно размножать во флаконах

G-Rex (коммерчески доступных от компании Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления позволяют популяциям клеток размножаться от уровня примерно 5×10^5 клеток/см² до уровня 10×10^6 - 30×10^6 клеток/см². В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без подпитки. В одном из вариантов осуществления это размножение происходит без подпитки, пока среда остается на высоте примерно 10 см во флаконе G-Rex. В одном из вариантов осуществления размножение происходит без подпитки, но при добавлении одного или более цитокинов. В одном из вариантов осуществления цитокин можно добавлять в виде болюса, без необходимости смешивания цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области и были использованы для размножения ОИЛ, они включают те, которые описаны в публикации патентной заявки США № US 2014/0377739 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2014/210036 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, публикации патентной заявки США № US 2011/0136228 A1, патенте США № US 8809050 B2, публикации международной патентной заявки № WO 2011/072088 A2, публикации патентной заявки США № US 2016/0208216 A1, публикации патентной заявки США № US 2012/0244133 A1, публикации международной патентной заявки № WO 2012/129201 A1, публикации патентной заявки США № US 2013/0102075 A1, патенте США № 8956860, публикации международной патентной заявки № WO 2013/173835 A1 и публикации патентной заявки США № US 2015/0175966 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие способы также описаны в публикации Jin, et al., *J. Immunotherapy* **2012**, 35, 283-292.

D. Необязательная генетическая модификация ОИЛ

[00706] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, необязательно, генетически модифицируют для включения дополнительных функциональных свойств, в том числе, но без ограничения, высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), например, TCR, нацеленного на опухоль-ассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерного антигенного рецептора (CAR), который связывается с опухоль-ассоциированной молекулой клеточной поверхности (например, мезотелином) или связанной с линией дифференцировки молекулой клеточной поверхности (например, CD19).

[00707]

E. Необязательное криоконсервирование ОИЛ

[00708] Либо суммарную популяцию ОИЛ, либо размноженную популяцию ОИЛ можно, необязательно, криоконсервировать. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют терапевтическую популяцию ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют ОИЛ, собранные после второго размножения. В некоторых вариантах осуществления криоконсервируют ОИЛ на иллюстративном этапе F Фигуры 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют в инфузионном мешке. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют до

помещения в инфузионный мешок. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют и не помещают в инфузионный мешок. В некоторых вариантах осуществления криоконсервирование проводят с использованием среды для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО). Криоконсервирование, как правило, выполняют, помещая популяцию ОИЛ в раствор для замораживания, например, содержащий 85% АВ сыворотки с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C , с переносом, необязательно, в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. См. Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986.

[00709] При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет разморожено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и, необязательно, промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ОИЛ можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области.

[00710] В предпочтительном варианте осуществления популяцию ОИЛ криоконсервируют с использованием среды для криоконсервирования CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). В предпочтительном варианте осуществления популяцию ОИЛ криоконсервируют с использованием среды для криоконсервирования, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО). В предпочтительном варианте осуществления популяцию ОИЛ криоконсервируют, используя смесь 1:1 (по объему) CS10 и среды для культивирования клеток. В предпочтительном варианте осуществления популяцию ОИЛ криоконсервируют, используя смесь примерно 1:1 (по объему) CS10 и среды для культивирования клеток, дополнительно содержащую П-2.

[00711] Как описано выше для этапов А-Е, криоконсервирование можно проводить в различные моменты времени на всем протяжении процесса размножения ОИЛ.

[00712] Как описано выше, и приведено в качестве примера на этапах А-Е Фигуры 8, криоконсервирование можно производить в самые разные моменты времени на всем протяжении процесса размножения ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать размноженную популяцию ОИЛ после второго размножения (как показано, например, для этапа D Фигуры А). Криоконсервирование, как правило, можно выполнять, помещая популяцию ОИЛ в раствор для замораживания, например, содержащий 85% АВ сыворотки с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C , с переносом, необязательно, в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. См. Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют в 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют в среде для

культивирования клеток плюс 5% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ криоконсервируют способами, описанными в Примере 16.

[00713] В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать суммарную популяцию ОИЛ после первого размножения на этапе В или размноженную популяцию ОИЛ после одного или более вторых размножений на этапе D. Криоконсервирование, как правило, можно выполнять, помещая популяцию ОИЛ в раствор для замораживания, например, содержащий 85% АВ сыворотки с инактивированным комплементом и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C , с переносом, необязательно, в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. См. Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* **2013**, 52, 978-986.

[00714] При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°C в водяной бане до тех пор, пока не будет разморожено примерно 4/5 раствора. Клетки, как правило, ресуспендируют в полной среде и, необязательно, промывают один или более раз. В некоторых вариантах осуществления размороженные ОИЛ можно подсчитывать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области.

[00715] В некоторых случаях популяцию ОИЛ, полученную на этапе В, можно криоконсервировать немедленно с использованием протоколов, описанных ниже. Альтернативно, суммарную популяцию ОИЛ можно проводить через этап С и этап D, а затем криоконсервировать после этапа D. Аналогично, в случае, когда в терапии будут использованы генетически модифицированные ОИЛ, популяции ОИЛ, полученные на этапе В или этапе D, можно подвергать генетическим модификациям для соответствующего лечения.

V. Способы лечения пациентов

[00716] Способы лечения начинают со сбора исходных ОИЛ и культивирования ОИЛ. Такие способы описаны в данной области, например, в публикации Jin et al., *J. Immunotherapy*, **2012**, 35(3):283-292, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Варианты осуществления способов лечения описаны в разделах, приведенных ниже, в том числе, в примерах.

[00717] Размноженные ОИЛ, полученные способами, описанными в настоящем документе, включая, например, способы, описанные для этапов А-F, выше (также представленные, например, на Фигуре 8), находят конкретное применение для лечения пациентов, страдающих от рака (например, как описано в публикации Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239, а также в дополнении; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления ОИЛ выращивали из резецированной метастатической меланомы, как описано ранее (смотри публикацию Dudley, et al., *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). Свежую опухоль можно иссекать в стерильных условиях. Репрезентативный образец можно отбирать для

формального анализа патологии. Можно использовать одиночные фрагменты размером от 2 мм³ до 3 мм³. В некоторых вариантах осуществления получают 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 20, 22, 24, 26 или 28 образцов для каждого пациента. В некоторых вариантах осуществления получают 24 образца для каждого пациента. Образцы можно помещать в отдельные лунки 24-луночного планшета, поддерживать в ростовой среде с высокой дозой ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) и контролировать на разрушение опухоли и/или пролиферацию ОИЛ. Любую опухоль с жизнеспособными клетками, оставшимися после обработки, можно расщеплять ферментами до одноклеточной суспензии и криоконсервировать, как описано в настоящем документе.

[00718] В некоторых вариантах осуществления можно отбирать образец успешно растущих ОИЛ для фенотипического анализа (CD3, CD4, CD8 и CD56) и тестировать в сравнении с аутологичной опухолью, при наличии. ОИЛ можно считать активными, если совместное культивирование в течение ночи приводит к секреции интерферона-гамма (IFN- γ) на уровнях >200 пг/мл и дважды превышающих уровень фона. (Goff, et al., *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847; полное содержание включено в настоящий документ посредством ссылки). В некоторых вариантах осуществления культуры с признаками аутологичной активности или подходящими паттернами роста можно выбирать для второго размножения (например, второго размножения, показанного на этапе D Фигуры 8), включая второе размножение, которое иногда называют быстрым размножением (ПБР). В некоторых вариантах осуществления размноженные ОИЛ с высокой аутологичной активностью (например, высокой степенью пролиферации в процессе второго размножения) выбирают для дополнительного второго размножения. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ с высокой аутологичной активностью (например, высокой степенью пролиферации в процессе второго размножения, как показано на этапе D Фигуры 8), выбирают для дополнительного второго размножения, как показано на этапе D Фигуры 8.

[00719] В некоторых вариантах осуществления для пациента не проводят сразу АПК (адоптивный перенос клеток), например, в некоторых вариантах осуществления после получения опухоли и/или первого размножения клетки не используют немедленно. В таких вариантах осуществления ОИЛ можно криоконсервировать и размораживать за 2 дня до введения пациенту. В таких вариантах осуществления ОИЛ можно криоконсервировать и размораживать за 1 день до введения пациенту. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно криоконсервировать и размораживать непосредственно перед введением пациенту.

[00720] Клеточные фенотипы образцов криоконсервированных ОИЛ из инфузионного мешка можно анализировать методом проточной цитометрии (например, FlowJo) на поверхностные маркеры CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любыми способами, описанными в настоящем документе. Сывороточные цитокины

можно определять стандартным методом твердофазного иммуноферментного анализа. Повышение в сыворотке уровня IFN- γ определяют на основании концентрации >100 пг/мл и превышения базовых уровней в 4-3 раза.

[00721] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на Фигуре 8, отличаются удивительным повышением клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на Фигуре 8, имеют повышенную клиническую эффективность в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления способы, иные, чем те, которые описаны в настоящем документе, включают способы, называемые способом 1С и/или способом поколения 1 (Gen 1). В некоторых вариантах осуществления повышенную эффективность определяют на основании ЧКЗ, ЧОО и/или других клинических ответов. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на Фигуре 8, демонстрируют аналогичное время до развития ответа и профиль безопасности в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8, например, способ Gen 1.

[00722] В некоторых вариантах осуществления IFN-гамма (IFN- γ) является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ в крови у субъектов, получавших лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления используют анализ эффективности, основанный на определении продуцирования IFN- γ . Продуцирование IFN- γ является другой мерой цитотоксического потенциала. Продуцирование IFN- γ можно измерять путем определения уровней цитокина IFN- γ в крови, сыворотке или ОИЛ *ex vivo* от субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления увеличение уровня IFN- γ является показателем эффективности лечения пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ увеличен в один раз, два раза, три раза, четыре раза или пять раз, или более в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые

представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в три раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в четыре раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в пять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют с использованием набора Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в ОИЛ ex vivo от субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в сыворотке ОИЛ от субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8.

[00723] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, включая те, которые не представлены на Фигуре 8, такими как, например, способы, называемые способом 1С. В некоторых вариантах осуществления значительно усовершенствованная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления поликлональность означает разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может быть показателем эффективности лечения, связанного с введением ОИЛ, полученных способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз, в два раза, в десять раз, в 100 раз, в 500 раз или в 1000 раз в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы,

чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в десять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 100 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 500 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 1000 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8.

[00724] Показатели эффективности могут включать количественные показатели частоты контроля заболевания (ЧКЗ), а также частоты общего ответа (ЧОО), как известно в данной области и описано в настоящем документе.

1. Способы лечения рака и других заболеваний

[00725] Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать для лечения заболеваний. В одном из вариантов осуществления они предназначены для использования в лечении гиперпролиферативных заболеваний. Они также могут быть использованы в лечении других заболеваний, описанных в настоящем документе и следующих далее параграфах.

[00726] В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой солидную злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления солидную злокачественную опухоль выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака

легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), рака почки и почечноклеточного рака. В некоторых вариантах осуществления гиперпролиферативное заболевание представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления гематологическое злокачественное новообразование выбирают из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы и лимфомы из клеток мантийной зоны.

[00727] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака популяцией ОИЛ, при этом пациент получает предварительное лечение немиелоаблативной химиотерапией до инфузии ОИЛ по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой введение циклофосфида в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дней 27 и 26 перед инфузией ОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м²/сутки в течение 5 дней (дней 27-23 перед инфузией ОИЛ). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ОИЛ (в день 0), в соответствии с настоящим изобретением, пациент получает внутривенную инфузию IL-2 в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности.

[00728] Эффективность соединений и сочетаний соединений, описанных в настоящем документе, для лечения, предотвращения и/или контроля указанных заболеваний или нарушений можно тестировать с использованием различных моделей, известных в данной области, которые позволяют разработать руководство по лечению заболевания человека. Например, модели для определения эффективности методов лечения рака яичника описаны, например, в Mullany, et al., *Endocrinology* **2012**, 153, 1585-92; и Fong, et al., *J. Ovarian Res.* **2009**, 2, 12. Модели для определения эффективности методов лечения рака поджелудочной железы описаны в Herreros-Villanueva, et al., *World J. Gastroenterol.* **2012**, 18, 1286-1294. Модели для определения эффективности методов лечения рака молочной железы описаны, например, в Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006**, 8, 212. Модели для определения эффективности методов лечения меланомы описаны, например, в Damsky, et al., *Pigment Cell & Melanoma Res.* **2010**, 23, 853-859. Модели для определения эффективности методов лечения рака легкого описаны, например, в Meuwissen, et al., *Genes & Development*, **2005**, 19, 643-664. Модели для определения эффективности методов лечения рака легкого описаны, например, в Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009**, 2, 55-60; и Sano, *Head Neck Oncol.* **2009**, 1, 32.

[00729] В некоторых вариантах осуществления IFN-гамма (IFN- γ) является показателем эффективности лечения гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления IFN- γ в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления используют анализ эффективности, основанный на определении продуцирования IFN- γ .

Продуцирование IFN- γ является другой мерой цитотоксического потенциала. Продуцирование IFN- γ можно измерять путем определения уровней цитокина IFN- γ в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способом по настоящему изобретению, обеспечивают повышенный уровень IFN- γ в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способом по настоящему изобретению, в сравнении с субъектами, получавшими лечение ОИЛ, полученными способами, называемыми способом 1С, представленным на Фигуре 13. В некоторых вариантах осуществления увеличение уровня IFN- γ является показателем эффективности лечения у пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ увеличен в один раз, два раза, три раза, четыре раза или пять раз, или более в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в три раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в четыре раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN- γ увеличена в пять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют с использованием набора Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют с использованием набора Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в ОИЛ ex vivo от пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В

некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в крови пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN- γ измеряют в сыворотке пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению.

[00730] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 8, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, включая те, которые не представлены на Фигуре 8, такими как, например, способы, называемые способом 1С. В некоторых вариантах осуществления значительно усовершенствованная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности при лечении рака. В некоторых вариантах осуществления поликлональность означает разнообразие Т-клеточного репертуара. В некоторых вариантах осуществления повышение поликлональности может быть показателем эффективности лечения, связанного с введением ОИЛ, полученных способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз, в два раза, в десять раз, в 100 раз, в 500 раз, или в 1000 раз в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в один раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в два раза в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в десять раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 100 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 500 раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8. В некоторых вариантах осуществления поликлональность повышена в 1000

раз в сравнении с не получавшим лечение пациентом и/или в сравнении с пациентом, получавшим лечение ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые предложены в настоящем документе, включая, например, иные способы, чем те, которые представлены на Фигуре 8.

2. Способы совместного введения

[00731] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные, как описано в настоящем документе, включая, например, ОИЛ, полученные способом, описанным для этапов А-Ф Фигуры 8, можно вводить в сочетании с одним или более регуляторами иммунных контрольных точек, такими как антитела, описанные ниже. Например, антитела, которые направлены на PD-1 и которые можно вводить совместно с ОИЛ по настоящему изобретению, включают, например, но не ограничиваются ими, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo[®]), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda[®]), гуманизованное анти-PD-1 антитело JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное анти-PD-1 антитело TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (анти-PD-1 мАт СТ-011, Medivation), анти-PD-1 моноклональное антитело BGB-A317 (BeiGene) и/или анти-PD-1 антитело SHR-1210 (ShangHai HengRui), человеческое моноклональное антитело REGN2810 (Regeneron), человеческое моноклональное антитело MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизованное анти-PD-1 IgG4 антитело PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления анти-PD-1 антитело происходит из клона: RMP1-14 (IgG крысы) - BioXcell каталожный номер № BP0146. Другие антитела, подходящие для использования в способах совместного введения с ОИЛ, полученными в соответствии с этапами А-Ф, описанными в настоящем документе, представляют собой анти-PD-1 антитела, раскрытые в патенте США № 8008449, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывает PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, за счет чего повышается иммунная активность. Любые антитела, известные в данной области, которые связывают PD-L1, нарушают взаимодействие между PD-1 и PD-L1 и стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, подходят для использования в способах совместного введения с ОИЛ, полученными в соответствии с этапами А-Ф, описанными в настоящем документе. Например, антитела, которые направлены на PD-L1 и проходят клинические испытания, включают BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие подходящие антитела, направленные на PD-L1, описаны в патенте США № 7943743, включенном в настоящий документ посредством ссылки. Специалист в данной области понимает, что любое антитело, которое связывает PD-1 или PD-L1, нарушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, подходит для использования в способах совместного введения с ОИЛ, полученными в соответствии с этапами А-Ф, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту, которому вводят ОИЛ, полученные в соответствии с этапами А-Ф, в сочетании, вводят и анти-PD-1 антитело, если пациент

имеет рак, рефрактерный при введении одного только анти-PD-1 антитела. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят ОИЛ в сочетании с анти-PD-1, когда пациент имеет рефрактерную меланому. В некоторых вариантах осуществления пациенту вводят ОИЛ в сочетании с анти-PD-1, когда пациент имеет немелкоклеточную карциному легкого (НМРЛ).

3. Необязательная предварительная лимфодеплегия пациентов

[00732] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу лечения рака популяцией ОИЛ, при этом пациент получает предварительное лечение немиелоаблативной химиотерапией до инфузии ОИЛ по настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления изобретение относится к популяции ОИЛ для использования в лечении рака у пациента, который получил предварительное лечение немиелоаблативной химиотерапией. В одном из вариантов осуществления популяция ОИЛ предназначена для введения инфузией. В одном из вариантов осуществления немиелоаблативная химиотерапия представляет собой введение циклофосфида в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дней 27 и 26 перед инфузией ОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м²/сутки в течение 5 дней (дней 27-23 перед инфузией ОИЛ). В одном из вариантов осуществления после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ОИЛ (в день 0), в соответствии с настоящим изобретением, пациент получает внутривенную инфузию IL-2 (альдеслейкин, коммерчески доступен под торговым названием пролейкин) в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности. В конкретных вариантах осуществления популяция ОИЛ предназначена для лечения рака в сочетании с IL-2, при этом IL-2 вводят после введения популяции ОИЛ.

[00733] Экспериментальные результаты показывают, что лимфодеплегия перед адаптивным переносом опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет элиминации регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («поглотителей цитокинов»). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения проводят этап лимфодеплеции (иногда также называемой «иммуносупрессивным кондиционированием») для пациента перед введением ОИЛ по изобретению.

[00734] Как правило, лимфодеплецию осуществляют путем введения флударабина или циклофосфида (активную форму называют мафосфамидом) и их сочетаний. Такие способы описаны в Gassner, et al., *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, 60, 75-85, Muranski, et al., *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006**, 3, 668-681, Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2008**, 26, 5233-5239, и Dudley, et al., *J. Clin. Oncol.* **2005**, 23, 2346-2357, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

[00735] В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 10 мг/кг/сутки, 15 мг/кг/сутки, 20

мг/кг/сутки, 25 мг/кг/сутки, 30 мг/кг/сутки, 35 мг/кг/сутки, 40 мг/кг/сутки или 45 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сутки.

[00736] В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активная форма циклофосфамида, достигает концентрации 0,5 мкг/мл - 10 мкг/мл при введении циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления мафосфамид, активная форма циклофосфамида, достигает концентрации 1 мкг/мл при введении циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или более. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в дозе 100 мг/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 (то есть, в/в). В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 4-5 дней в дозе 250 мг/м²/сутки в/в. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 4 дней в дозе 250 мг/м²/сутки в/в.

[00737] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецию осуществляют путем совместного введения пациенту флударабина и циклофосфамида. 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 дней.

[00738] В одном из вариантов осуществления лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м²/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м²/сутки в течение пяти дней.

4. Режимы введения ПЛ-2

[00739] В одном из вариантов осуществления режим введения ПЛ-2 представляет собой режим введения высоких доз ПЛ-2, при этом режим введения высоких доз ПЛ-2 включает внутривенное введение альдеслейкина, или его биологического аналога или варианта, начиная на следующий день после введения терапевтически эффективной порции терапевтической популяции ОИЛ, при этом альдеслейкин, либо его биологический аналог или вариант, вводят в дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (массы тела пациента) в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности, максимально 14 доз. После 9 дней отдыха эту схему введения можно повторять для следующих 14 доз, всего максимально 28 доз.

[00740] В одном из вариантов осуществления режим введения ПЛ-2 представляет собой «декрешендо» режим введения ПЛ-2. «Декрешендо» режимы введения ПЛ-2 описаны в публикациях O'Day, et al., J. Clin. Oncol. **1999**, 17, 2752-61 и Eton, et al., Cancer **2000**, 88, 1703-9, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. В одном из вариантов осуществления «декрешендо» режим введения ПЛ-2 включает

введение 18×10^6 МЕ/м² внутривенно в течение 6 часов, с последующим введением 18×10^6 МЕ/м² внутривенно в течение 12 часов, с последующим введением 18×10^6 МЕ/м² внутривенно в течение 24 часов, с последующим введением $4,5 \times 10^6$ МЕ/м² внутривенно в течение 72 часов. Этот цикл лечения можно повторять каждые 28 дней, используя максимально четыре цикла. В одном из вариантов осуществления «декрещендо» режим введения П-2 включает введение 18000000 МЕ/м² в день 1, 9000000 МЕ/м² в день 2 и 4500000 МЕ/м² в дни 3 и 4.

[00741] В одном из вариантов осуществления режим введения П-2 включает введение пегилированного П-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 дней в дозе от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

5. Адоптивный перенос клеток

[00742] Адоптивный перенос клеток (АПК) является очень эффективной формой иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью в организм пациентов, страдающих от рака. АПК представляет собой подход к лечению, который включает идентификацию *in vitro* лимфоцитов с противоопухолевой активностью, размножение *in vitro* этих клеток до большого числа клеток и их инфузию хозяину, страдающему от рака. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, могут быть получены из стромы резецированных опухолей (опухоль-инфильтрирующие лимфоциты или ОИЛ). ОИЛ для АПК могут быть получены, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ получают, например, способом, описанным на Фигуре 8. Они также могут быть получены, или происходить, из крови, если они генетически модифицированы для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR), обогащены смешанными культурами опухолевых лимфоцитов (СКОЛ) или клонированы с использованием аутологичных антигенпредставляющих клеток и полученных из опухоли пептидов. АПК, в котором лимфоциты получены от имеющего рак хозяина, которому они вновь будут введены инфузией, называют аутологичным АПК. В патентной публикации США № 2011/0052530 описан способ проведения адоптивной клеточной терапии для стимуляции регрессии опухоли, главным образом, при лечении пациентов, страдающих от метастатической меланомы, полное описание данных способов включено посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть введены, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть введены в одной дозе. Такое введение можно выполнять путем инъекции, например, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ и/или цитотоксические лимфоциты могут быть введены в нескольких дозах. Дозирование можно выполнять один раз, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз, или более шести раз, в год. Дозирование можно выполнять один раз в месяц, один раз каждые две недели, один раз в неделю или один раз через день. Введение ОИЛ и/или цитотоксических лимфоцитов можно продолжать так долго, как это необходимо.

6. Иллюстративные варианты осуществления лечения

[00743] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака популяцией опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы (а) получения первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента; (b) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 5 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2; (с) проведения быстрого размножения второй популяции ОИЛ с использованием популяции миелоидных искусственных антигенпредставляющих клеток (миелоидных иАПК) во второй среде для культивирования клеток, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ через 7 дней после начала быстрого размножения; и при этом вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2 и ОКТ-3; (d) введения терапевтически эффективного количества третьей популяции ОИЛ пациенту, страдающему от рака. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для использования в лечении рака, при этом популяция ОИЛ может быть получена способом, включающим этапы (b) проведения начального размножения первой популяции ОИЛ, полученной из опухоли, резецированной у пациента, в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 5 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом первая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2; (с) проведения быстрого размножения второй популяции ОИЛ с использованием популяции миелоидных искусственных антигенпредставляющих клеток (миелоидных иАПК) во второй среде для культивирования клеток, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ через 7 дней после начала быстрого размножения; и при этом вторая среда для культивирования клеток содержит ИЛ-2 и ОКТ-3; (d) введения терапевтически эффективного количества третьей популяции ОИЛ пациенту, страдающему от рака. В некоторых вариантах осуществления способ включает первый этап (а) получения первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента. В некоторых вариантах осуществления ИЛ-2 присутствует в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл, и антитело ОКТ-3 присутствует в начальной концентрации примерно 30 нг/мл во второй среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления первое размножение проводят в течение периода времени, не превышающего 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера. В некоторых вариантах осуществления второе размножение проводят с использованием газопроницаемого контейнера. В некоторых вариантах осуществления соотношение второй популяции ОИЛ и популяции иАПК на этапе быстрого размножения составляет от 1 к 80 до 1 к 400. В некоторых вариантах

осуществления соотношение второй популяции ОИЛ и популяции иАПЖ на этапе быстрого размножения составляет примерно 1 к 300. В некоторых вариантах осуществления рак для лечения выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичника, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ)), рака почки и почечноклеточного рака. В некоторых вариантах осуществления рак для лечения выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака яичника и рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак для лечения представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления рак для лечения представляет собой рак яичника. В некоторых вариантах осуществления рак для лечения представляет собой рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака дополнительно включает этап лечения пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции до введения третьей популяции ОИЛ пациенту. В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфида в дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{сутки}$ в течение пяти дней. В некоторых вариантах осуществления режим введения высоких доз IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг альдеслейкина, либо его биологического аналога или варианта, в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, используемые для лечения, находились в контакте с одной или более сд-РНК, нацеленными на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, которые могут быть добавлены в среду для культивирования клеток во время первого и/или второго размножения, например, этапов В, С и/или D на Фигуре 8, при этом ОИЛ и другие средства могут быть добавлены в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, используемые для лечения, находились в контакте с одной или более сд-РНК, нацеленными на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, которые могут быть добавлены в среду для культивирования клеток во время первого и/или второго размножения, например, этапов В, С и/или D на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, используемые для лечения, находились в контакте с одной или более сд-РНК, нацеленными на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, которые могут быть добавлены в среду для культивирования клеток во время первого и/или

второго размножения, например, этапов В, С и/или D на Фигуре 8, в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, используемые для лечения, находились в контакте с одной или более сд-РНК, нацеленными на гены, описанные в настоящем документе, включая PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, которые могут быть добавлены в среду для культивирования клеток во время первого и/или второго размножения, например, этапов В, С и/или D на Фигуре 8, два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

ПРИМЕРЫ

[00744] Далее варианты осуществления настоящего изобретения описаны со ссылкой на следующие примеры. Эти примеры приведены исключительно с целью иллюстрации, и изобретение, описанное в настоящем документе, никоим образом не должно считаться ограниченным данными примерами, а скорее, должно считаться охватывающим любые, и все, вариации, которые станут очевидными на основании идей, изложенных в настоящем документе.

Пример 1: Анализы закрытой системы

[00745] Как описано в настоящем документе, были разработаны протоколы и анализы для получения ОИЛ из опухолей пациентов в закрытой системе.

[00746] В данном примере описан новый сокращенный способ получения клинически значимых количеств ОИЛ из тканей резецированных опухолей пациентов в устройствах G-REX и криоконсервирование конечного клеточного препарата. Дополнительные аспекты способа описаны в Примерах 2-8.

Процедура

[00747] Предварительная подготовка: День 0 (выполняли до 36 часов ранее), готовили промывающий буфер для выделения ОИЛ (TIWB) путем добавления в 500 мл сбалансированного солевого раствора Хэнка (HBSS) 50 мкг/мл гентамицина. Из маточного 10 мг/мл раствора гентамицина переносили 2,5 мл в HBSS. Из маточного 50 мг/мл раствора переносили 0,5 мл в HBSS.

[00748] Готовили среду CM1 с GlutaMax™ в соответствии с LAB-005 «Приготовление среды для пре-ПБР и ПБР» из инструкций для CM2». Хранили при 4°C до 24 часов. Оставляли нагреваться до 37°C в течение по меньшей мере 1 часа перед использованием.

[00749] Извлекали аликвоту(ы) IL-2 из морозильной камеры на -20°C и помещали аликвоту(ы) в холодильник на 2-8°C. Извлекали образец опухоли и хранили при 4°C до обработки.

[00750] Отправляли неиспользованную опухоль либо в HypoThermasol, либо в виде замороженных фрагментов в CryoStor CS10 (обе среды коммерчески доступны от BioLife

Solutions, Inc.).

Обработка опухоли для получения ОИЛ

[00751] Асептически переносили следующие материалы в БББ, по мере необходимости, и маркировали в соответствии с Таблицей 16, ниже.

ТАБЛИЦА 16. Материалы для выделения опухоли

Наименование	Минимальное количество	Маркировка в ходе процесса
Опухоль	1	Н/П
Чашка Петри, 150-мм	1	Измельчение
Чашка Петри, 100-мм	4	Промывание 1, 2, 3, 4
Чашка Петри, 100-мм	1	Неподходящая ткань
6-луночный планшет	2	Этикетка на крышке - «Опухолевые фрагменты» На дне планшета - «Подходящая ткань»
Линейка	2	Н/П
Промывающий буфер	1	Н/П
Пинцет	1	Н/П
Длинный пинцет	1	Н/П
Скальпель	По мере необходимости	Н/П

[00752] Переносили 5 мл гентамицина в бутылку с HBSS. Маркировали TIWB. Вращали для перемешивания. Переносили пипеткой 50 мл TIWB в каждую чашку. Используя длинный пинцет, извлекали опухоль(и) из флакона для образцов и переносили в чашку для промывания 1. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания в течение 3 минут. Переносили опухоль в чашку для промывания и инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания в течение 3 минут. Повторяли промывание в новой чашке для промывания.

[00753] Измеряли и записывали длину опухоли. Проводили начальное измельчение кусков опухоли в чашке для измельчения на 10 промежуточных кусков и принимали меры для сохранения опухолевой структуры каждого промежуточного куска. Работая каждый раз с одним промежуточным куском опухоли, тщательно нарезали опухоль на фрагменты размером до 3×3×3 мм. Повторяли процедуру для остальных промежуточных кусков опухоли.

[00754] Если было доступно менее 4 опухолевых фрагментов, использовали другие доступные фрагменты для достижения цели получения 40 фрагментов. Если имелось менее 40 фрагментов, 10-40 помещали в один флакон G-REX 100M.

Засевание флакона G-REX 100M

[00755] Асептически переносили следующие материалы в БББ, по мере необходимости, и маркировали в соответствии с Таблицей 17, ниже.

ТАБЛИЦА 17. Дополнительные материалы для засеваемых флаконов

Наименование	Минимальное количество	Маркировка в ходе процесса
Флакон G-REX 100M	По мере необходимости	Лот №
Теплая СМ1	По мере необходимости	Лот №
Аликвоты IL-2	По мере необходимости	Лот №

[00756] Добавляли на каждый литр СМ1 1 мл маточного раствора IL-2 (6×10^6 МЕ/мл).

[00757] Помещали 1000 мл предварительно нагретой СМ1, содержащей 6000 МЕ/мл IL-2, в каждый нужный биореактор G-REX 100M в соответствии с Таблицей 18, ниже. При помощи пипетки для переноса переносили соответствующее число опухолевых фрагментов в каждый флакон G-REX 100M, распределяя фрагменты в соответствии с Таблицей 18. Если один или более опухолевых фрагментов, перенесенных во флакон G-REX 100M, всплывали, отбирали один дополнительный опухолевый фрагмент, при наличии, из чашки для подходящей ткани и переносили его во флакон G-REX 100M. Записывали общее число фрагментов, добавленных в каждый флакон. Помещали каждый биореактор G-REX 100M в инкубатор при 37°C, 5% CO₂.

[00758] Если было получено >41 фрагмента, помещали 1000 мл предварительно нагретой полной среды СМ1 во второй биореактор G-REX 100M.

ТАБЛИЦА 18. Необходимое число биореакторов G-REX

Число фрагментов	G-REX	Число G-REX	Необходимое количество СМ1
1-40	G-REX 100M	1	1000 мл
41-80 распределить между флаконами	G-REX 100M	2	2000 мл
>80	Заморозить фрагменты в CS10 после 15 минут преинкубации		

Предварительная подготовка: День 11 (выполняли до 24 часов ранее)

[00759] Готовили 6 л СМ2 с GlutaMax. Использовали для справки лабораторные документы «Приготовление среды для пре-ПБР и ПБР» из инструкций для СМ2». Нагревали до 37°C за 1 час до использования. Размораживали аликвоты IL-2: извлекали аликвоты IL-2 из морозильной камеры и оставляли при 4°C.

Сбор ОИЛ (День 11)

[00760] Извлекали флаконы G-REX 100M из инкубатора и помещали в БББ2. Проявляли осторожность, чтобы не потревожить клетки на дне флакона. Используя GatherRex или перистальтический насос, проводили аспирацию ~900 мл супернатанта

среды для культивирования клеток из флакона(ов). Ресуспендировали ОИЛ, осторожно вращая флакон. Контролировали, чтобы все клетки вышли из мембраны. Переносили оставшуюся клеточную суспензию в соответствующего размера пакет для переноса крови (300-1000 мл). Проявляли осторожность, чтобы фрагменты не были перенесены в пакет для переноса крови. Прокалывали пакет для переноса 4" инструментом из набора для переливания плазмы. Перемешивали клеточную суспензию и, используя 3-мл шприц, отбирали 1 мл суспензии ОИЛ для подсчета клеток. Помещали пакет для переноса крови в инкубатор до использования.

Приготовление среды

[00761] Оставляли среду нагреваться до 37°C в течение >1 часа. Добавляли 3 мл маточного 6×10^6 МЕ/мл раствора rhIL-2 к 6 л CM2 для достижения конечной концентрации 3000 МЕ/мл rhIL-2 («полная среда CM2»). Стерильно соединяли сваркой 4" набор для переливания плазмы с канюлей Люэра с 1-л пакетом для переноса. Переносили 500 мл полной среды CM2 в 1-л пакет для переноса. Используя 1,0-мл шприц с иглой, отбирали до 150 мкл 1 мг/мл анти-CD3 (клон ОКТ3) и переносили в 500 мл «полной среды CM2». Хранили при 37°C до использования.

Подготовка флакона

[00762] Переносили 4,5 л «полной среды CM2» во флакон G-REX 500M и помещали флакон в инкубатор при 37°C до готовности.

Размораживание облученных питающих клеток

[00763] Использовали $5,0 \times 10^9$ аллогенных облученных питающих клеток от двух или более доноров. Извлекали питающие клетки из морозильной камеры с LN₂. Размораживали питающие клетки в инкубаторе при 37°C или в бане с гранулами. Извлекали питающие клетки из бани, когда они почти полностью разморожены, но все еще холодные. Добавляли каждый пакет с питающими клетками непосредственно в открытый G-Rex 500M для гарантии достаточного количества облученных клеток (5×10^9 клеток, $\pm 20\%$). Извлекали 1-л пакет для переноса с 500 мл «полной среды CM2» + ОКТ3 и переносили в БББ. Отбирали все содержимое пакетов с питающими клетками в шприц, записывали объем, и вносили $5,0 \times 10^9$ аллогенных облученных питающих клеток в пакет для переноса.

[00764] Если было достигнуто целевое количество клеток $\pm 10\%$ ($5,0 \times 10^9$) с жизнеспособностью >70%, продолжали действия. Если было достигнуто менее 90% от целевого количества клеток ($5,0 \times 10^9$) с жизнеспособностью >70%, размораживали другой пакет и повторяли действия, описанные выше. Если было достигнуто более 110% от целевого количества клеток, рассчитывали надлежащий объем, необходимый для нужной дозы клеток, и продолжали действия.

Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток во флаконе G-REX 500M

[00765] Извлекали флакон G-REX 500M, содержащий приготовленную среду, из инкубатора. Соединяли пакет для переноса с питающими клетками с G-REX 500M и позволяли содержимому пакета перетекать в 500M. Рассчитывали объем суспензии ОИЛ,

который должен быть добавлен для достижения общего количества 200×10^6 жизнеспособных клеток.

$$(ОКЖК/мл) / 200 \times 10^6 = мл$$

[00766] Если ОИЛ содержали всего $5-200 \times 10^6$ жизнеспособных клеток, добавляли все ОИЛ (весь объем) в G-REX 500M. Если в ОИЛ общее количество жизнеспособных клеток превышало 200×10^6 , добавляли рассчитанный объем, необходимый для распределения 200×10^6 ОИЛ в отдельный флакон G-REX 500M. Оставшиеся ОИЛ осаждали центрифугированием и замораживали в по меньшей мере двух криопробирках при плотности $10^8/мл$ в CS10, маркировали названием ОИЛ и датой заморозки.

[00767] Помещали G-REX 500M в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 , на 5 дней.

Предварительная подготовка: день 16-18

[00768] Нагревали один 10-л мешок AIM-V для культур, иницированных менее 50×10^6 ОИЛ, нагревали два мешка для культур, иницированных более 50×10^6 ОИЛ, при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа или до готовности к использованию.

Проведение подсчета клеток ОИЛ: день 16-18

[00769] Извлекали флакон G-REX 500M из инкубатора и проявляли осторожность, чтобы не потревожить культуру клеток на дне флакона. Отбирали 4 л среды для культивирования клеток из флакона G-REX 500M и помещали в стерильный контейнер. Вращали G-REX 500M до тех пор, когда все ОИЛ переходили в суспензию с мембраны. Переносили клеточную суспензию в 2-л пакет для переноса. Оставляли флакон 500M для последующего использования. Рассчитывали общее количество флаконов, необходимых для субкультивирования, по следующей формуле. Округляли значения в большую сторону.

$$\text{Общее количество жизнеспособных клеток} / 1,0 \times 10^9 = \text{количество флаконов}$$

Приготовление СМ4

[00770] Готовили 10-л мешок AIM-V для каждой двух необходимых флаконов 500M. При необходимости, нагревали дополнительную среду. Для каждой необходимой 10-л AIM-V добавляли 100 мл GlutaMAX, получая СМ4. Добавляли в среду СМ4 rhIL-2 до конечной концентрации 3000 МЕ/мл rhIL-2. Разделяли клеточную культуру. Наполняли каждый флакон G-REX 500M до 5 л. Поровну распределяли объем ОИЛ среди рассчитанного количества G-REX 500M. Помещали флаконы в инкубатор при 37°C , 5% CO_2 , до сбора клеток в день 22 ПБР.

Предварительная подготовка: день 22-24

[00771] Готовили 2 л промывающего буфера с 1% ЧСА путем добавления 40 мл 25% ЧСА в каждый из двух 1-л мешков с PlasmaLyte A 7.4. Объединяли в вспомогательном мешке LOVO. Добавляли 200 мл CS10 с IL-2 в концентрации 600 МЕ/мл. Предварительно охлаждали четыре 750-мл алюминиевых емкости для морозильной камеры при 4°C .

Сбор ОИЛ: день 22-24

[00772] Извлекали флаконы G-REX 500M из инкубатора с 37°C и проявляли

осторожность, чтобы не потревожить культуру клеток на дне флакона. Удаляли аспирацией и отбрасывали 4,5 л супернатанта среды для культивирования клеток из каждого флакона. Вращали флакон G-REX 500M для полного ресуспендирования ОИЛ. Собирали ОИЛ в мешок для проведения биопроцессов. Тщательно перемешивали содержимое мешка и, используя 3-мл шприц, отбирали 2×2-мл образца для подсчета клеток. Взвешивали мешок и определяли разницу между начальной и конечной массой. Использовали следующую формулу для расчета объема клеточной суспензии.

$$\text{Масса-нетто клеточной суспензии (мл)} / 1,03 = \text{объем (мл)}$$

[00773] Фильтровали ОИЛ и готовили исходный мешок LOVO. После того, как все клетки были перенесены в исходный мешок LOVO, закрывали все зажимы, герметично закрывали трубку исходного мешка LOVO, удаляя фильтр, и взвешивали. Рассчитывали объем.

[00774] Формулировали ОИЛ в соотношении 1:1 в холодной среде CS10, содержащей 600 ME/мл rhIL-2.

[00775] Рассчитывали необходимое количество криомешков.

(объем клеточного препарата x 2) / 100 = необходимое количество мешков (округляли в меньшую сторону)

[00776] Рассчитывали объем, распределяемый в каждый мешок.

(объем клеточного препарата x 2) / необходимое количество мешков = объем, добавляемый в каждый мешок

[00777] Асептически переносили следующие материалы, перечисленные в Таблице 19, в БББ.

ТАБЛИЦА 19. Материалы для криоконсервирования ОИЛ

Наименование	Минимальное количество	Маркировка в ходе процесса
Клеточный препарат	1	Лот №
Алюминиевая кассета для морозильной камеры (750-мл)	1	Н/П
Холодная CS10+IL-2 с концентрацией 600 ME/мл	По мере необходимости	Лот №
Соединительное устройство для клеток CC1	1	Н/П
750-мл криомешки	Рассчитанное количество	Маркировка аликвот 1 - максимальный №
100-мл шприц	Кол-во криомешков +1	Н/П
3-сторонний запорный клапан	1	Н/П

Криопробирки	5	Вспомогательные емкости для криопрепарата ОИЛ
--------------	---	---

Формулирование ОИЛ

[00778] Соединяли мешок для конечного препарата LOVO, крепление Люэра мешка с CS10 и соответствующее количество криомешков. Необходимый объем CS10 эквивалентен объему мешка для конечного препарата LOVO. Перемешивали содержимое мешка для конечного препарата LOVO путем переворачивания.

[00779] Переносили 100 мл сформулированного препарата в каждый криомешок. Удаляли все воздушные пузыри из криомешка и герметично закрывали. Переносили герметично закрытые мешки на 4°C и помещали в предварительно охлажденные алюминиевые емкости для морозильной камеры.

Криоконсервирование ОИЛ с использованием морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки (CRF)

[00780] Выполняли стандартную операционную процедуру для использования морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки. После использования CRF хранили криомешки в жидком азоте (LN₂).

Пример 2: Лимфодеплеция

[00781] Подсчет клеток можно производить в день 7 и перед проведением лимфодеплеции. Конечный клеточный препарат содержал до примерно 150×10^9 жизнеспособных клеток, сформулированных в среде, содержащей минимум 50% НуроThermosol™ в Plasma-Lyte A™ (по объему) и до 0,5% ЧСА (совместимой для инфузии человеку) с содержанием 300 МЕ/мл IL2. Конечный препарат был доступен для введения в одном из двух объемов для инфузии:

1) 250 мл (в инфузионном мешке емкостью 300 мл), если общее количество собранных ОИЛ составляет $\leq 75 \times 10^9$

ИЛИ

2) 500 мл (в инфузионном мешке емкостью 600 мл), если общее количество собранных ОИЛ составляет $< 150 \times 10^9$.

[00782] Общее количество клеток, которое может быть получено для конечного инфузионного препарата ОИЛ для каждого пациента, невозможно предсказать вследствие вариации между пациентами скорости размножения Т-клеток во время этапа ПБР. Минимальный предел количества клеток в день 3, 4, 5, 6 и 7 3-14-дневного ПБР устанавливают на основании минимального количества клеток, необходимого для принятия решения о проведении пациенту лимфодеплеции с применением режима химиотерапии, заключающегося во введении циклофосфамида и флударабина. После начала лимфодеплеции на основании наличия этого минимально необходимого количества клеток, авторы изобретения намерены лечить пациента доступным количеством ОИЛ, полученным в ПБР в любой из дней 3-14, и во многих случаях в день 7. Верхний предел диапазона для инфузии (150×10^9 жизнеспособных клеток) основан на известном опубликованном верхнем пределе количества клеток, которое можно вводить

безопасно с достижением клинического ответа. Radvanyi, et al., Clin Cancer Res **2012**, 18, 6758-6770.

Пример 3: Способ 2А - день 0

[00783] В данном примере описан подробно день 0 протокола для способа 2А, описанного в Примерах 3-6.

[00784] Подготовка.

[00785] Убеждались, что среда для промывания опухоли, CM1 и IL-2 находилась в пределах срока годности. Помещали CM1 (клеточная среда 1) в инкубатор.

Метод.

[00786] Готовили среду CM1 для ОИЛ, содержащую 6000 МЕ/мл IL-2: 1 л CM1 и 1 мл IL-2 (6000000 МЕ/мл). Помещали 25 мл CM1+IL2 в 50-мл коническую пробирку, которая будет использована для фрагментов при добавлении к G-REX, и помещали в инкубатор на 37°C для предварительного нагревания.

[00787] Закачивали 975 мл предварительно нагретой CM1, содержащей 6000 МЕ/мл IL-2, в каждый биореактор G-REX 100MCS. Помещали G-REX 100MCS в инкубатор до момента использования.

Измельчение ткани

[00788] Записывали время начала обработки опухоли. Переносили пипеткой 3-5 мл среды для промывания опухоли в каждую лунку одного из шестилуночных планшетов для избыточных кусков опухоли. Переносили пипеткой 50 мл среды для промывания опухоли в чашки для промывания 1-3 и чашку для размещения. Помещали две 150-мм чашки для измельчения в бокс биологической безопасности. Помещали 3 стерильные 50-мл конические пробирки в БББ. Добавляли 5-20 мл среды для промывания опухоли в каждую коническую пробирку. Пинцеты и скальпели окунали в среду для промывания опухоли по мере необходимости в процессе промывания и измельчения опухоли.

[00789] Извлекали опухоль(и) из флакона для образцов и переносили в чашку для промывания 1. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 1 в течение ≥ 3 минут. Переносили опухоль в чашку для промывания 2. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 2 в течение ≥ 3 минут. Переносили опухоль в чашку для промывания 3. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 3 в течение ≥ 3 минут. Переносили опухоль в чашку для измельчения, измеряли и записывали длину опухоли.

[00790] Проводили начальное измельчение кусков опухоли в чашке для измельчения на промежуточные куски, принимая меры для сохранения опухолевой структуры каждого промежуточного куска. Переносили любые промежуточные куски опухоли, не измельчаемые активно на фрагменты, в чашку для размещения для гарантии того, что ткань остается гидратированной на протяжении всей процедуры измельчения.

[00791] Работая каждый раз с одним промежуточным куском опухоли, тщательно нарезали опухоль на фрагменты размером примерно 3×3×3 мм в чашке для измельчения.

Продолжали измельчение на фрагменты промежуточных кусков опухоли до измельчения всей ткани промежуточных кусков. Выбирали подходящие фрагменты, и при помощи пипетки для переноса переносили до 4 подходящих фрагментов в капли промывающей среды в одном кружке лотка для опухолевых фрагментов. Используя пипетку для переноса, скальпель или пинцет, переносили максимально возможное количество неподходящей ткани и отходов в чашку для неподходящей ткани. Всю оставшуюся ткань помещали в одну из лунок шестилуночного планшета. (Неподходящая ткань содержит желтую жировую ткань или некротическую ткань). Продолжали обработку для остальных промежуточных кусков опухоли, обрабатывая по одному промежуточному куску за раз, до завершения обработки всей опухоли.

[00792] Переносили до 50 лучших опухолевых фрагментов в 50-мл коническую пробирку, маркированную «для опухолевых фрагментов», содержащую CM1. Удаляли всплывающие фрагменты из 50-мл конической пробирки. Записывали число опухолевых фрагментов и всплывших фрагментов. Вращали коническую пробирку с опухолевыми фрагментами и выливали содержимое 50-мл конической пробирки во флакон G-REX 100MCS. Если один или более опухолевых фрагментов, перенесенных во флакон G-REX 100M, всплывали, отбирали один дополнительный опухолевый фрагмент, при наличии, из лотка для подходящей ткани и переносили его во флакон G-REX 100M.

[00793] Записывали номер(а) инкубатора и общее количество фрагментов, добавленное в каждый флакон. Помещали биореактор G-REX 100M в инкубатор при 37°C, 5% CO₂.

Пример 4: Способ 2А - день 11

[00794] В данном примере описан подробно день 11 протокола для способа 2А, описанного в Примерах 3-6.

Предварительная подготовка.

За день до манипуляций:

[00795] CM2 можно готовить за день до манипуляций. Хранят при 4°C.

[00796] День проведения манипуляций.

[00797] Готовили набор принадлежностей для питающих клеток. Готовили 5 мл среды для криоконсервирования в соответствии с STF-FORM-318 и помещали на 4°C до момента использования.

[00798] Готовили флакон G-Rex 500MCS. Используя 10-мл шприц, асептически переносили 0,5 мл IL-2 (маточный раствор, содержащий 6×10^6 МЕ/мл) в каждый литр CM2 (клеточная среда 2) в мешке для проведения биопроцессов через неиспользуемый стерильный коннектор канюли Люэра. Убеждались, что весь IL-2 смешан со средой. Закачивали 4,5 литра среды CM2 в G-Rex 500MCS. Помещали G-Rex 500MCS в инкубатор.

Подготовка облученных питающих клеток

[00799] Записывали сухую массу 1-л пакета для переноса (TP). Закачивали 500 мл CM2 по массе в TP. Размораживали питающие клетки в водяной бане при 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Тщательно перемешивали конечный препарат питающих клеток. Используя 5-мл шприц и безыгольный порт, промывали порт некоторым количеством клеточного раствора для гарантии точности отбора образцов, отбирали 1 мл клеток и помещали в пробирку для подсчета. Проводили подсчет одиночных клеток в образце питающих клеток, записывали данные и добавляли первичные данные подсчета к документации на партию. Если число клеток составляло $<5 \times 10^9$, размораживали больше клеток, подсчитывали и добавляли к питающим клеткам. Повторно взвешивали пакет с питающими клетками и рассчитывали объем. Рассчитывали объем клеток для удаления.

[00800] Добавление питающих клеток в G-REX

[00801] Тщательно перемешивали клетки и удаляли объем, рассчитанный, как описано выше, для достижения количества $5,0 \times 10^9$ клеток. Отбрасывали ненужные клетки. Используя 1-мл шприц и иглу 18G для отбора 0,150 мл ОКТЗ, извлекали иглу и переносили в ТР для питающих клеток через канюлю Люэра. Стерильно соединяли сваркой пакет с питающими клетками с красной линией на G-Rex 500MCS. Снимали зажим с линии и позволяли питающим клеткам перетекать во флакон под действием силы тяжести. Возвращали G-Rex 500MCS в инкубатор и записывали время.

[00802] Подготовка ОИЛ: записывали время начала сбора ОИЛ

[00803] Осторожно извлекали G-REX 100MCS из инкубатора. Используя GatheRex, переносили ~900 мл культурального супернатанта в 1-л пакет для переноса. Вращали флакон до открепления всех клеток от мембраны. Проверляли мембрану, чтобы убедиться, что все клетки откреплены. Отклоняли флакон от собирающей трубки и позволяли опухолевым фрагментам оседать вдоль края. Медленно наклоняли флакон в сторону собирающей трубки так, чтобы фрагменты оставались на противоположной стороне флакона. Используя GatheRex, переносили остаточную клеточную суспензию в 300-мл пакет для переноса, избегая опухолевых фрагментов. Повторно убеждались, что все клетки удалены с мембраны. При необходимости, производили обратное промывание, открывая зажимы на GatheRex и позволяя некоторому количеству среды протекать во флакон G-REX 100MCS под действием силы тяжести. Энергично постукивали по флакону для отделения клеток и перекачивали их в 300-мл ТР. После завершения сбора закрывали красную линию и запечатывали сваркой.

Записывали массу (включая сухую массу) 300-мл ТР, содержащего клеточную суспензию, и рассчитывали объем клеточной суспензии. Тщательно перемешивали клетки. Асептически соединяли 5-мл шприц, отбирали 1 мл, помещали в криопробирку. Повторяли со вторым шприцем. Эти образцы использовали для подсчета и определения жизнеспособности клеток. Помещали в инкубатор и записывали время помещения в инкубатор. Производили подсчет одиночных клеток в каждом образце и записывали данные. При необходимости, корректировали общую плотность жизнеспособных ОИЛ до $\leq 2 \times 10^8$ жизнеспособных клеток. Рассчитывали объем для удаления, или оставляли пометку, что корректировка не нужна.

[00804] Переносили избыток клеток в соответствующего размера коническую

пробирку и помещали в инкубатор с неплотно закрытой крышкой для последующего криоконсервирования.

[00805] Извлекали G-Rex 500MCS из инкубатора и закачивали клетки во флакон. Возвращали G-Rex 500MCS в инкубатор и записывали время помещения G-Rex в инкубатор.

Криоконсервирование избытка клеток

[00806] Рассчитывали количество среды для замораживания, которое будет добавлено к клеткам:

ТАБЛИЦА 20: Целевая концентрация клеток составляла 1×10^8 /мл

А. Общее количество удаленных клеток (из этапа 15)	мл
В. Целевая концентрация клеток	1×10^8 клеток/мл
Добавляемый объем среды для замораживания (А/В)	мл

[00807] Осаждали центрифугированием ОИЛ при 400xg в течение 5 мин при 20°C с полным тормозом и полным ускорением. Асептически удаляли аспирацией супернатант. Ресуспендировали клетки в оставшейся жидкости и, в процессе ресуспендирования, медленно добавляли подготовленную среду для замораживания. Разделяли на аликвоты и помещали на -80°C.

Пример 5: Способ 2А - день 16

[00808] В данном примере описан подробно день 16 протокола для способа 2А, описанного в Примерах 3-6.

Сбор и подсчет ОИЛ.

[00809] Нагревали 10-л мешок с CM4 для культур, инициированных менее 50×10^6 ОИЛ, в инкубаторе при 37°C в течение по меньшей мере 30 минут или до готовности к использованию. Извлекали флакон G-Rex 500MCS из инкубатора и, используя GatheRex, переносили ~4 л культурального супернатанта в 10-л Labtainer™. Собирали клетки согласно соответствующим инструкциям для сбора клеток GatheRex.

[00810] После удаления супернатанта вращали флакон до открепления всех клеток от мембраны. Наклоняли флакон для того, чтобы трубка находилась на краю флакона. Используя GatheRex, переносили остаточную клеточную суспензию в 2-л ТР, продолжая наклонять край, до тех пор, пока не были собраны все клетки. Проверяли мембрану на прикрепленные клетки. Энергично постукивали флакон для отделения клеток. Добавляли клетки в 2-л ТР. Запечатывали сваркой 2-л пакет для переноса. Записывали массу пакета для переноса с клеточной суспензией и рассчитывали объем клеточной суспензии. Определяли объем клеточной суспензии, включая сухую массу.

[00811] Осторожно перемешивали клетки, отбирали 11 мл и разделяли на аликвоты, как показано в Таблице 21.

ТАБЛИЦА 21. Параметры тестирования

Тест	Объем образца	Емкость
Определение	2-2 мл образца	Криопробирки

количества и жизнеспособности клеток		
Микоплазма	1 мл	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования.
Стерильность	1 мл	Инокулируют по 0,5 мл в каждый из флаконов для аэробного и анаэробного культивирования
Проточная цитометрия	2-2 мл	Подсчет неиспользованных клеток (криоконсервированных для будущего тестирования партии)
Остаток клеток		Отбрасывали

[00812] Рассчитывали новый объем и записывали объем в 2-л пакете для переноса на основании объема клеточной суспензии и объема, отобранного для КК (11 мл).

[00813] Инокулировали и заказывали тестирование на стерильность. Хранили образец для анализа микоплазмы на 4°C в штативе с образцами, ожидающими тестирование микоплазмы. Откладывали до высевания ОИЛ.

Подсчет клеток

[00814] Проводили подсчет одиночных клеток, записывали данные и добавляли первичные данные подсчета к документации на партию. Документировали разбавление. Документировали программу подсчета клеток Cellometer. Проверяли, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer. Рассчитывали общее количество флаконов, необходимых для субкультивирования.

Добавление IL-2 к CM

[00815] Помещали 10-л мешок AIM-V с Glutamax. Отбирали 5 мл IL-2 в шприц (конечная концентрация составляла 3000 МЕ/мл) и выпускали IL-2 в мешок. Повторяли для остальных мешков с AIM-V.

Подготовка флаконов G-REX500MCS

Определяли количество CM4 для добавления во флаконы. Записывали объем клеток, добавляемых в каждый флакон, и объем CM4 5000 мл-А. Помещали флаконы в условия 37°C, 5% CO₂.

Засевание флаконов ОИЛ

[00816] Помещали мешок для клеточного препарата на аналитические весы и записывали время добавления ОИЛ во флакон G-REX. Тщательно перемешивали клетки. Повторяли перенос клеток для всех флаконов. Помещали флаконы в условия 37°C, 5% CO₂, и записывали время добавления ОИЛ во флакон G-REX. Заказывали тестирование седиментационных пластин в микробиологической лаборатории, а также тестирование на стерильность (аэробные и анаэробные микроорганизмы).

[00817] Крриоконсервирование текущих или избыточных клеток

[00818] Рассчитывали необходимое количество среды для замораживания: Целевая концентрация клеток составляла 1×10^8 /мл; записывали общее количество удаленных клеток. Целевая концентрация клеток составляла 1×10^8 клеток/мл. Рассчитывали общий объем добавляемой среды для замораживания.

[00819] Готовили среду для криоконсервирования и помещали на 40°C до использования. Осаждали центрифугированием ОИЛ при 400xg в течение 5 мин при 20°C с полным тормозом и полным ускорением. Удаляли аспирацией супернатант. Осторожно постукивали по дну пробирки для ресуспендирования клеток в оставшейся жидкости, и, продолжая осторожно постукивать по пробирке, медленно добавляли подготовленную среду для замораживания. Разливали аликвоты в соответствующего размера маркированные криопробирки. Помещали в морозильную камеру на -80°C . В пределах 72 часов переносили в место постоянного хранения, документировали и записывали дату и время помещения в морозильную камеру на -80°C .

Пример 6: Способ 2А - день 22

[00820] В данном примере описан подробно день 22 протокола для способа 2А, описанного в Примерах 3-6.

Предварительная подготовка

[00821] Помещали три 1-л мешка с PlasmaLyte А в БББ. Объединяли и маркировали мешки с PlasmaLyte А с 1% ЧСА. Готовили 120 мл 25% ЧСА для переноса. Переносили ЧСА в 3-л мешок с PlasmaLyte. Тщательно перемешивали. Отбирали 5 мл PlasmaLyte с 1% ЧСА из безыгольного порта на 3-литровом мешке. Маркировали как промывающий буфер LOVO и датировали.

[00822] Подготовка ПЛ-2

[00823] Вносили Plasmalyte/1% ЧСА из 5-мл шприца в маркированную 50-мл стерильную коническую пробирку. Добавляли 0,05 мл маточного раствора ПЛ-2 в пробирку, содержащую PlasmaLyte, и маркировали ПЛ-2 6×10^4 . Хранили при $2-8^\circ\text{C}$.

Подготовка клеток

[00824] Извлекали флаконы G-REX 500M из инкубатора с температурой 37°C . Используя насос GatherRex, уменьшали объем содержимого первого флакона. Вращали флакон G-REX 500M до полного ресуспендирования ОИЛ, при этом избегая разбрызгивания или вспенивания. Убеждались, что все клетки отделились от мембраны. Наклоняли флакон G-Rex так, что клеточная суспензия собиралась на той стороне флакона, где расположена заборная трубка. Запускали GatherRex для сбора клеточной суспензии и убеждались, что все клетки были удалены из флакона. Если клетки оставались во флаконе, вновь добавляли 100 мл супернатанта во флакон, вращали и собирали в мешок для клеточной суспензии. Повторяли процедуру для следующих флаконов. Запечатывали и маркировали как исходный мешок LOVO. Записывали сухую массу.

[00825] Позволяли ОИЛ перетекать из мешка для клеточной суспензии через

фильтр в исходный мешок LOVO. После переноса всех клеток в исходный мешок LOVO, закрывали все зажимы, запечатывали сваркой чуть выше отметки и отсоединяли. Тщательно перемешивали содержимое мешка и, используя два 3-мл шприца, отбирали 2 независимых 2-мл образца из порта для отбора образцов шприцем для подсчета и определения жизнеспособности клеток. Взвешивали мешок и определяли разницу между начальной и конечной массой. Записывали данные, включая сухую массу, и помещали в инкубатор.

Подсчет клеток.

[00826] Проводили подсчет одиночных клеток в каждом образце, записывали данные и добавляли первичные данные подсчета к документации на партию. Документировали программу подсчета клеток Cellometer. Проверяли, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer. Определяли общее количество ядросодержащих клеток. Определяли количество ОКЯК, которое необходимо удалить для достижения количества, равного $1,5 \times 10^{11}$ клеток, для обработки LOVO. Помещали удаленные клетки в соответствующего размера контейнер для утилизации.

Сбор клеток LOVO

[00827] 10-л Labtainer™ с удлинительной инфузионной линией Бакстера на этапе предварительной подготовки представлял собой мешок для заместительного фильтрата, соединенный сваркой с набором LOVO. Следовали инструкциям на дисплее LOVO. Для начала процедуры выбирали протокол «Сбор клеток ОИЛ G-Rex» из выпадающего меню на экране выбора протокола и следовали инструкциям.

[00828] Когда на дисплее появлялась надпись «объем конечного препарата (объем ретентанта)», используя значение общего количества ядросодержащих клеток (ОКЯК) из Таблицы 22, определяли целевой объем конечного препарата в таблице, приведенной ниже (Таблица 23). Вводили объем конечного препарата (мл), связанный с диапазоном клеток, в процессе настройки процедуры LOVO.

ТАБЛИЦА 22. Определение целевого объема конечного препарата

Диапазон клеток	Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)
0 <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 7,1E10$	150
$7,1E10$ <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1,1E11$	200
$1,1E11$ <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1,5E11$	250

ТАБЛИЦА 23. Целевой объем препарата

Общее количество ядросодержащих клеток (ОКЯК) $\times 10^6$	Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)
---	--

--	--

[00829] Для введения конкретного объема из Таблицы 16 нажимали на поле ввода объема конечного препарата (мл). На дисплее появлялась цифровая клавиатура. Вводили нужный объем конечного препарата в единицах (мл).

[00830] Делали пометку об объемах, показанных для фильтрата и раствора 1 (написано PlasmaLyte).

[00831] Выполняли предварительное покрытие мешка ИМ. Перемешивали исходный мешок. Во время процедуры LOVO система автоматически делала паузы, чтобы оператор мог манипулировать разными мешками. Во время разных пауз на дисплее появлялись разные надписи. Следовали соответствующим инструкциям в каждом случае.

Пауза для промывания исходного мешка

[00832] После опустошения исходного мешка LOVO добавлял промывающий буфер в исходный мешок для промывания мешка. После добавления рассчитанного объема промывающего буфера в исходный мешок, LOVO автоматически делал паузу и на дисплее появлялась надпись для паузы «промывание исходного мешка».

[00833] LOVO прокачивал промывающую жидкость из исходного мешка, затем продолжалась автоматическая процедура.

Пауза для перемешивания мешка ИМ

[00834] Для подготовки клеток к очередному проходу через вращающее устройство в мешок ИМ добавляли промывающий буфер. После добавления промывающего буфера в мешок ИМ LOVO автоматически делал паузу и появлялся экран для паузы «перемешивание мешка ИМ».

[00835] Когда на дисплее появлялась надпись для паузы «перемешивание мешка ИМ», оператор переворачивал мешок ИМ несколько раз для тщательного перемешивания клеточной суспензии. Следовали инструкциям для возобновления прокачки LOVO жидкости из мешка ИМ.

Пауза для разминания углов ИМ

[00836] Во время последнего цикла промывания процедуры LOVO клетки выкачивали из мешка ИМ через вращающее устройство и в мешок ретентата (конечного препарата). Когда мешок ИМ пустел, добавляли 10 мл промывающих буферов в нижний порт мешка ИМ для промывания мешка. После добавления промывающей жидкости LOVO автоматически делал паузу и на дисплее появлялась надпись «разминание углов ИМ».

[00837] Когда на дисплее появлялась надпись для паузы «разминание углов ИМ», оператор разминал углы мешка для перевода всех оставшихся клеток в суспензию. Возобновляли выкачивание LOVO промывающей жидкости из мешка ИМ.

[00838] После завершения процедуры LOVO на дисплее появлялась надпись «удаление продуктов».

[00839] Записывали данные с экрана «сводные результаты» в Таблицу 24.

ТАБЛИЦА 24. Таблица сводных результатов LOVO

Время, затраченное на обработку (в скобках #)	Время, затраченное на обработку источника (в скобках #)	Время пауз	Объем источника (мл)	Объем ретентата (мл)	Объем фильтрата (мл)	Объем раствора 1 (мл)
A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.

[00840] Процедура выключения LOVO

[00841] Записывали объем конечного сформулированного препарата. Рассчитывали необходимое количество IL-2 из таблицы для конечного препарата.

<p>A. Рассчитанное количество IL-2, необходимое для конечного препарата. (300 ME/мл IL-2 в конечном препарате):</p> <p>Объем конечного препарата (мл) [Объем сформулированного клеточного препарата из таблицы объема конечного сформулированного препарата] x 300 ME/мл = требуем. ME IL-2</p> <p>_____ мл x 300 ME = _____ требуем. ME IL-2</p> <p>B. Требуем. ME IL-2 ÷ рабочее разведение маточного раствора (концентрация 6×10^4 ME/мл), полученное на этапе приготовления IL-2 = объем (мл) IL-2 для добавления к конечному препарату.</p> <p>_____ требуем. ME IL-2, выше] ÷ 60000 ME/мл = _____ мл рабочего раствора IL-2</p>

[00842] Определяли количество криомешков и объем архивного образца.

[00843] Отмечали в таблице для целевого объема и объема архивного образца, ниже, количество мешков для криоконсервирования и объем архивного образца для препарата.

[00844] Расчет целевого объема/мешок: (Конечный сформулированный объем - объем, скорректированный на извлечение менее 100% = 10 мл)/количество мешков.

[00845] Готовили клетки в соотношении 1:1 (по объему) с CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions) и IL-2.

[00846] Готовили клетки с IL-2 и подключали устройство. Помещали клетки и устройство в транспортный мешок и помещали в условия 2-8°C на ≤15 мин.

Добавление CS10

[00847] Отбирали количество холодной CS10, определенное в таблице «Конечный объем сформулированного препарата». Медленно и с осторожным перемешиванием добавляли CS10 (1:1, по объему) к клеткам.

[00848] Внесение сформулированного клеточного препарата в криомешки

[00849] Заменяли шприц соответствующего размера шприцем для объема клеток, который будет внесен в каждый криомешок. Перемешивали клеточный препарат. Открывали зажим, ведущий к мешку для клеточного препарата, и отбирали соответствующий объем.

Запись объема конечного препарата

[00850] Используя безыгольный порт и соответствующего размера шприц, отбирали определенное ранее количество для архивного образца. Помещали архивный образец в 50-мл коническую пробирку, маркированную «архивный образец». Используя шприц, соединенный с набором принадлежностей, удаляли весь воздух из мешка, втягивая клетки до расстояния примерно 1” за пределами мешка в трубку. Помещали в условия 2-8°C. Перемешивали клетки в мешке для клеточного препарата и повторяли этапы 3-8 для остальных мешков CS750, используя новый шприц на запорном клапане и новый шприц для отбора архивного образца клеток. Архивный образец должен быть отложен для обработки после того, как препарат будет в CRF.

Процедура для морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки (CRF) (смотри также пример 16)

[00851] Морозильную камеру поддерживали при 4°C до помещения в нее образцов. Помещали образцы в CRF.

[00852] Ждали до момента, когда CRF вернется к температуре 4°C. После достижения температуры запускали программу CRF для криоконсервирования. Проводили визуальную инспекцию криомешков в отношении следующего (примечание: не инспектировали на переполнение или недостаточное заполнение): целостность контейнера, целостность портов, целостность герметичных уплотнений, наличие сгустков клеток и наличие частиц.

[00853] Помещали криомешки в предварительно подготовленные кассеты и переносили в CRF. Равномерно распределяли кассеты на полках в CRF. Прикрепляли ленточную термопару к центральной кассете, или помещали фиктивный мешок в центральное положение.

[00854] Закрывали дверцу CRF. После того, как температура камеры достигала 4°C ± 1,5°C, нажимали кнопку «выполнить» на интерфейсе компьютера. Записывали время и температуру камеры при перенесении препарата в CRF.

[00855] Обработка образца для контроля качества

Асептически переносили следующие материалы в БББ, по мере необходимости, и маркировали в соответствии с Таблицей 25 для КК и архивных образцов. 1 пробирку для подсчета клеток, 1 пробирку для анализа эндотоксина, 1 пробирку для анализа микоплазмы, 1 пробирку для окрашивания по Граму, 1 пробирку для рестимуляции и 1 пробирку для проточной цитометрии доставляли в отдел КК для немедленного тестирования. Оставшиеся дубликаты пробирок помещали в морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки.

ТАБЛИЦА 25. Инструкции по тестированию и хранению

Тест	Емкость
Количество и жизнеспособность клеток	Криопробирки
Микоплазма	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования
Стерильность	Инокулируют 0,5 мл во флакон для анаэробного, и 0,5 мл во флакон для аэробного, культивирования
Окраска по Граму	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования
Эндотоксин	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования
Проточная цитометрия	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования
Архивный образец после формулирования	Криоконсервируют для следующего тестирования: набор из 5 отдельных пробирок, 1 пробирка для подсчета клеток, 1 пробирка для анализа эндотоксина, 1 пробирка для анализа микоплазмы, 1 пробирка для окрашивания по Граму и 1 пробирка для проточной цитометрии для немедленного тестирования КК
Рестимуляция	Образец доставляют при комнатной температуре, и анализ следует начинать в пределах 30 минут после результата подсчета клеток

[00856] Подсчет клеток

[00857] Проводили подсчет одиночных клеток в каждом образце, записывали данные и добавляли первичные данные подсчета к документации на партию. Документировали программу подсчета клеток Cellometer. Проверяли, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer.

[00858] Криоконсервирование клеток архивного образа после формулирования: помещали пробирку в CRF. Переносили в место хранения после завершения замораживания, записывали дату и время помещения в CFR. Записывали дату и время перемещения в LN₂.

[00859] Микробиологическое тестирование: заказывали тестирование на стерильность (аэробные и анаэробные микроорганизмы).

После криоконсервирования мешков с клеточным препаратом

[00860] Останавливали морозильную камеру после завершения прогона. Извлекали

криомешки из кассет. Переносили кассеты в паровую фазу LN₂.

Пример 7: Использование коктейля цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21

[00861] В данном примере описано использование цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21, которые служат в качестве дополнительных Т-клеточных факторов роста, в сочетании со способом получения ОИЛ примеров 1-10.

[00862] Используя способ примеров 1-10, выращивали ОИЛ из колоректального рака, меланомы, рака шейки матки, трижды негативного рака молочной железы, рака легкого и рака почки в присутствии IL-2 в одной экспериментальной группе, и в присутствии, вместо IL-2, сочетания IL-2, IL-15 и IL-21 в другой экспериментальной группе при инициации культуры. После завершения пре-ПБР культуры оценивали на размножение, фенотип, функцию (CD107a+ и IFN- γ) и репертуар TCR V β . IL-15 и IL-21 описаны в другом разделе настоящего документа и в публикации Grujil, et al., IL-21 promotes the expansion of CD27+CD28+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells, Santegoets, S. J., J Transl Med., **2013**, 11:37 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/>).

[00863] Результаты показали, что имело место усиленное размножение ОИЛ (>20%), как в случае CD4⁺, так и CD8⁺ клеток, в условиях обработки IL-2, IL-15 и IL-21 опухолей с разной гистологией, в сравнении с использованием только IL-2. Наблюдали уклон в сторону преимущественной представленности CD8⁺ популяции со смещением репертуара TCR V β в ОИЛ, полученных в культурах, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, в сравнении с культурами, обработанными лишь IL-2. Уровни IFN- γ и CD107a были повышены в ОИЛ, обработанных IL-2, IL-15 и IL-21, в сравнении с ОИЛ, обработанными лишь IL-2.

Пример 8: Многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 с участием пациентов, страдающих от меланомы

[00864] Это многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 разработано для оценки безопасности и эффективности терапии при помощи ОИЛ, полученных способом 1С (описанным в настоящем документе), для пациентов с метастатической меланомой. В каждую из групп один и два будут включены до 30 пациентов, и группа три будет представлять собой группу повторного лечения со второй инфузией ОИЛ вплоть до десяти пациентам. В первых двух группах оценивают два разных способа производства: способ 1С и вариант осуществления способа 2А (описанный в примерах 1-10, соответственно). Пациенты в группе один получают свежие, не криоконсервированные ОИЛ, и пациенты в группе два получают препарат, произведенный способом, описанным в примерах 1-10, результатом которого является криоконсервированный препарат. Дизайн исследования представлен на ФИГ. 26. Данное исследование представляет собой многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 для оценки безопасности и эффективности аутологичных ОИЛ в лечении субпопуляций пациентов с метастатической меланомой. Ключевые критерии включения в исследование являются следующими: поддающаяся измерению метастатическая меланома с возможностью резекции ≥ 1 лезии

для получения ОИЛ; по меньшей мере один предшествующий курс системной терапии; возраст ≥ 18 лет и показатель общего состояния по шкале ECOG, составляющий 0-1. Группы лечения включают следующие варианты: использование не криоконсервированного препарата ОИЛ (полученного с использованием способа 1С), криоконсервированного препарата ОИЛ (полученного с использованием варианта осуществления способа 2А), а также повторное лечение препаратом ОИЛ пациентов с отсутствием ответа или с прогрессированием заболевания после начального ответа. Основным определяемым параметром является безопасность, и вторичным определяемым параметром является эффективность, определяемая на основании частоты объективных ответов (ЧОО), процента пациентов с полной ремиссией (ППР), выживаемости без прогрессирования (ВБП), продолжительности ответа (ПО) и общей выживаемости (ОВ).

Пример 9: Оценка на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови

[00865] В данном примере описан новый сокращенный способ оценки на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК, также известных как МК) для использования в качестве аллогенных питающих клеток в иллюстративных способах, описанных в настоящем документе.

[00866] Каждый лот облученных питающих клеток МК получали от отдельного донора. Проводили скрининг каждого лота, или донора, на способность обеспечивать размножение ОИЛ в ПБР в присутствии очищенного анти-CD3 (клон ОКТ3) антитела и интерлейкина-2 (IL-2). Кроме того, каждый лот питающих клеток тестировали без добавления ОИЛ для подтверждения того, что полученная доза гамма-излучения была достаточной для утраты ими способности к репликации.

Вводная информация

[00867] Гамма-облученные, остановленные в росте питающие МК были необходимы для ПБР ОИЛ. Мембранные рецепторы на питающих МК связывают анти-CD3 (клон ОКТ3) антитело и перекрестно связываются с ОИЛ во флаконе ПБР, стимулируя ОИЛ к размножению. Лоты питающих клеток получали путем лейкофереза цельной крови от отдельных доноров. Лейкоферезный препарат центрифугировали в градиенте плотности фиколл-пак, промывали, облучали и криоконсервировали в условиях GMP.

[00868] Важно, чтобы пациентам, получающим ОИЛ-терапию, не были введены инфузией жизнеспособные питающие клетки, поскольку это может приводить к развитию реакции трансплантат против хозяина (GVHD). Вследствие этого рост питающих клеток останавливают, подвергая клетки воздействию гамма-излучения, что приводит к разрывам в двухцепочечной ДНК и потере жизнеспособности МК при повторном культивировании.

Критерии оценки и дизайн эксперимента

[00869] Лоты питающих клеток оценивали на основании двух критериев: 1) их способности обеспечивать при совместном культивировании увеличение количества ОИЛ

в >100 раз и 2) их неспособности к репликации.

[00870] Лоты питающих клеток тестировали в формате мини-ПБР, используя две первичные линии пре-ПБР ОИЛ, выращенные в вертикальных флаконах T25 для культивирования тканей. Лоты питающих клеток тестировали с двумя разными линиями ОИЛ, поскольку каждая линия ОИЛ является уникальной в своей способности пролиферировать в ответ на активацию в ПБР. В качестве контроля параллельно с тестируемыми лотами тестировали лот облученных питающих МК, которые, как уже было показано, соответствуют критерию, приведенному выше.

[00871] Для гарантии того, что все лоты, протестированные в одном эксперименте, прошли эквивалентное тестирование, получали достаточно стоков одних и тех же линий пре-ПБР ОИЛ для тестирования всех условий и всех лотов питающих клеток.

[00872] Для каждого тестируемого лота питающих клеток использовали всего шесть флаконов T25: пре-ПБР ОИЛ линия № 1 (2 флакона); пре-ПБР ОИЛ линия № 2 (2 флакона) и контроль для питающих клеток (2 флакона). Для флаконов, содержащих ОИЛ линий № 1 и № 2, оценивали способность лота питающих клеток обеспечивать размножение ОИЛ. Для флаконов с контролем для питающих клеток оценивали неспособность к репликации лота питающих клеток.

Протокол эксперимента

День -2/3, размораживание линий ОИЛ

[00873] Готовили среду CM2. Нагревали CM2 в водяной бане с температурой 37°C. Готовили 40 мл CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2. Поддерживали теплой до использования. Помещали 20 мл предварительно нагретой CM2 без IL-2 в каждую из двух 50-мл конических пробирок, маркированных названиями используемых линий ОИЛ. Извлекали две намеченные линии пре-ПБР ОИЛ из хранилища в LN₂ и переносили флаконы в помещение для культивирования тканей. Размораживали флаконы, помещая их в герметичном пакете для хранения с застежкой-молнией в водяную баню с температурой 37°C до того, как останется небольшое количество льда.

[00874] Используя стерильную пипетку для переноса, немедленно переносили содержимое флакона в 20 мл CM2 в подготовленную маркированную 50-мл коническую пробирку. QS до 40 мл, используя CM2 без IL-2 для промывания клеток. Центрифугировали при 400xCF в течение 5 минут. Удаляли аспирацией супернатант и ресуспендировали в 5 мл теплой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2.

[00875] Отбирали небольшую аликвоту (20 мкл) в двух повторах для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Записывали количество клеток. На время подсчета помещали 50-мл коническую пробирку с клетками ОИЛ в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO₂, с неплотно закрытой крышкой для газообмена. Определяли концентрацию клеток и разбавляли ОИЛ до 1×10^6 клеток/мл в CM2, содержащей IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл.

[00876] Культивировали в объеме 2 мл/лунку 24-луночного планшета для культивирования тканей в необходимом количестве лунок в инкубаторе с температурой

37°C и увлажненной атмосферой до дня 0 мини-ПБР. Культивировали разные линии ОИЛ в отдельных 24-луночных планшетах для культивирования тканей во избежание путаницы и потенциального перекрестного загрязнения.

День 0, начало мини-ПБР

[00877] Готовили достаточно среды CM2 для тестируемого количества лотов питающих клеток. (Например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовили 800 мл среды CM2). Разделяли на аликвоты часть CM2, приготовленной, как описано выше, и добавляли в нее 3000 МЕ/мл IL-2 для культивирования клеток. (Например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовили 500 мл среды CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2).

[00878] Работая с каждой линией ОИЛ отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения, извлекали 24-луночный планшет с культурой ОИЛ из инкубатора и переносили в БББ.

[00879] Используя стерильную пипетку для переноса или 100-1000 мкл пипеточный дозатор и наконечник, отбирали примерно 1 мл среды из каждой лунки с ОИЛ, которые будут использованы, и помещали в неиспользованную лунку 24-луночного планшета для культивирования тканей.

[00880] Используя свежую стерильную пипетку для переноса или 100-1000 мкл пипеточный дозатор и наконечник, перемешивали остальную среду с ОИЛ в лунках для ресуспендирования клеток, а затем переносили клеточную суспензию в 50-мл коническую пробирку, маркированную названием ОИЛ, и записывали объем.

[00881] Промывали лунки запасной средой и переносили этот объем в ту же самую 50-мл коническую пробирку. Осаждали клетки центрифугированием при 400xCF для получения осадка клеток. Удаляли аспирацией супернатант среды и ресуспендировали клеточный осадок в 2-5 мл среды CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2, используемый объем основан на количестве лунок, из которых собраны клетки, и размере осадка - объем должен быть достаточным для достижения концентрации $>1,3 \times 10^6$ клеток/мл.

[00882] Используя серологическую пипетку, тщательно перемешивали клеточную суспензию и записывали объем. Отбирали 200 мкл для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. На время подсчета помещали 50-мл коническую пробирку с клетками ОИЛ в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO₂, с неплотно закрытой крышкой для газообмена. Записывали количество клеток.

[00883] Извлекали 50-мл коническую пробирку, содержащую клетки ОИЛ, из инкубатора и ресуспендировали клетки до концентрации $1,3 \times 10^6$ клеток/мл в теплой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2. Возвращали 50-мл коническую пробирку в инкубатор с неплотно закрытой крышкой.

[00884] Повторяли описанные выше этапы для второй линии ОИЛ.

[00885] Непосредственно перед помещением ОИЛ во флаконы T25 для эксперимента ОИЛ разбавляли 1:10 до конечной концентрации $1,3 \times 10^5$ клеток/мл в соответствии с приведенным ниже описанием.

Подготовка рабочего раствора MACS GMP чистого анти-CD3 (ОКТ3) антитела [00886] Извлекали маточный раствор ОКТ3 (1 мг/мл) из холодильника на 4°C и помещали в БББ. Использовали конечную концентрацию 30 нг/мл ОКТ3 в среде для мини-ПБР.

[00887] Было необходимо 600 нг ОКТ3 для 20 мл в каждом флаконе T25 для эксперимента; это эквивалентно 60 мкл 10 мкг/мл раствора для каждого 20 мл, или 360 мкл для всех 6 флаконов, тестируемых для каждого лота питающих клеток.

[00888] Для каждого тестируемого лота питающих клеток готовили 400 мкл разведенного 1:100 1 мг/мл раствора ОКТ3 для получения рабочей концентрации 10 мкг/мл (например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовили 1600 мкл разведенного 1:100 1 мг/мл раствора ОКТ3: 16 мкл 1 мг/мл раствора ОКТ3+1,584 мл среды CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2).

Подготовка флаконов T25

[00889] Маркировали каждый флакон, и заполняли флакон средой CM2 перед приготовлением питающих клеток. Помещали флакон в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO₂ для поддержания среды теплой в ожидании добавления остальных компонентов. После приготовления питающих клеток компоненты будут добавлены в среду CM2 в каждый флакон.

ТАБЛИЦА 26: Растворы

Компонент	Объем флаконах совместного культивирования	Объем во флаконах для контрольных (только питающие клетки) флаконах
CM2+3000 МЕ/мл IL-2	18 мл	19 мл
МК: $1,3 \times 10^7$ /мл в CM2+3000 МЕ IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^7$ /флакон)	1 мл	1 мл
ОКТ3: 10 мкг/мл в CM2+3000 МЕ IL-2	60 мкл	60 мкл
ОИЛ $1,3 \times 10^5$ /мл в CM2 с 3000 МЕ IL-2 (конечная концентрация $1,3 \times 10^5$ /флакон)	1 мл	0

Подготовка питающих клеток

[00890] Было необходимо минимум 78×10^6 питающих клеток на каждый лот, тестируемый по данному протоколу. Каждый 1-мл флакон, замороженный в SDBB, содержал 100×10^6 жизнеспособных клеток после размораживания. Предполагая 50% извлечение после размораживания из хранилища с LN₂, рекомендуется размораживать по меньшей мере два 1-мл флакона питающих клеток на каждый лот, с учетом использования 100×10^6 жизнеспособных клеток для каждого ПБР. Альтернативно, если клетки поставляются в 1,8-мл флаконах, только один флакон обеспечит нужное количество питающих клеток.

[00891] Перед размораживанием питающих клеток предварительно нагревали примерно 50 мл СМ2 без П-2 для каждого тестируемого лота питающих клеток. Извлекали флаконы выбранного лота питающих клеток из хранилища с LN₂, помещали в пакет для хранения с застежкой-молнией и помещали на лед. Размораживали флаконы внутри закрытого пакета для хранения с застежкой-молнией, помещая его в водяную баню с температурой 37°C. Извлекали флаконы из пакета с застежкой-молнией, опрыскивали или протирали 70% EtOH и переносят флаконы в БББ.

[00892] Используя пипетку для переноса, немедленно переносили содержимое флаконов с питающими клетками в 30 мл нагретой СМ2 в 50-мл конической пробирке. Промывали флакон небольшим объемом СМ2 для удаления остаточных клеток во флаконе. Центрифугировали при 400xCF в течение 5 минут. Удаляли аспирацией супернатант и ресуспендировали в 4 мл нагретой СМ2, содержащей 3000 МЕ/мл П-2. Отбирали 200 мкл для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Записывали количества клеток.

[00893] Ресуспендировали клетки в концентрации $1,3 \times 10^7$ клеток/мл в теплой СМ2, содержащей 3000 МЕ/мл П-2. Разбавляли клетки ОИЛ от концентрации $1,3 \times 10^6$ клеток/мл до $1,3 \times 10^5$ клеток/мл.

Организация совместного культивирования

[00894] Разбавляли клетки ОИЛ от концентрации $1,3 \times 10^6$ клеток/мл до $1,3 \times 10^5$ клеток/мл. Добавляли 4,5 мл среды СМ2 в 15-мл коническую пробирку. Извлекали клетки ОИЛ из инкубатора и тщательно ресуспендировали, используя 10-мл серологическую пипетку. Отбирали 0,5 мл клеток из суспензии ОИЛ с концентрацией $1,3 \times 10^6$ клеток/мл и добавляли к 4,5 мл среды в 15-мл коническую пробирку. Возвращали флакон со стоком ОИЛ в инкубатор. Тщательно перемешивали. Повторяли для второй линии ОИЛ.

Переносили флаконы с предварительно нагретой средой для одного лота питающих клеток из инкубатора в БББ. Перемешивали питающие клетки путем пипетирования их вверх-вниз несколько раз, используя 1-мл пипетку с наконечником, и переносили 1 мл ($1,3 \times 10^7$ клеток) в каждый флакон для данного лота питающих клеток. Добавляли 60 мкл рабочего маточного раствора ОКТЗ (10 мкг/мл) в каждый флакон. Возвращали два контрольных флакона в инкубатор.

[00895] Переносили 1 мл ($1,3 \times 10^5$) каждого лота ОИЛ во флакон T25 с соответствующей маркировкой. Возвращали флаконы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении. Оставляли до дня 5.

[00896] Повторяли процедуры для всех тестируемых лотов питающих клеток.

День 5, смена среды

Готовили СМ2 с 3000 МЕ/мл П-2. Для каждого флакона необходимо 10 мл. Используя 10-мл пипетку, переносили 10 мл теплой СМ2 с 3000 МЕ/мл П-2 в каждый флакон. Возвращали флаконы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 7. Повторяли процедуры для всех тестируемых лотов питающих клеток.

День 7, сбор клеток

[00897] Извлекали флаконы из инкубатора и переносили в БББ, стараясь не тревожить клеточный слой на дне флакона. Не тревожа клетки, растущие на дне флаконов, отбирали 10 мл среды из каждого тестируемого флакона и 15 мл среды из каждого контрольного флакона.

[00898] Используя 10-мл серологическую пипетку, ресуспендировали клетки в оставшейся среде и тщательно перемешивали для разрушения любых сгустков клеток. После тщательного перемешивания клеточной суспензии пипетированием, отбирали 200 мкл для подсчета клеток. Подсчитывали количество ОИЛ, используя соответствующую стандартную операционную процедуру с оборудованием для автоматического подсчета клеток. Записывали количества клеток в день 7.

[00899] Повторяли процедуры для всех тестируемых лотов питающих клеток.

[00900] Питающие клетки в контрольных флаконах оценивали на неспособность к репликации, и флаконы, содержащие ОИЛ, оценивали на кратность увеличения количества со дня 0 в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 27, ниже.

День 7, продолжение культивирования питающих клеток в контрольных флаконах до дня 14

[00901] После завершения подсчета питающих клеток в контрольных флаконах в день 7 добавляли 15 мл свежей среды CM2, содержащей 3000 ME/мл IL-2, в каждый из контрольных флаконов. Возвращали контрольные флаконы в инкубатор и инкубировали в вертикальном положении до дня 14.

День 14, продолжение оценки отсутствия пролиферации питающих клеток в контрольных флаконах

[00902] Извлекали флаконы из инкубатора и переносили в БББ, стараясь не тревожить клеточный слой на дне флакона. Не тревожа клетки, растущие на дне флаконов, отбирали примерно 17 мл среды из каждого контрольного флакона. Используя 5-мл серологическую пипетку, ресуспендировали клетки в оставшейся среде и тщательно перемешивали для разрушения любых сгустков клеток. Записывали объем для каждого флакона.

[00903] После тщательного перемешивания клеточной суспензии пипетированием отбирали 200 мкл для подсчета клеток. Подсчитывали количество клеток, используя соответствующую стандартную операционную процедуру с оборудованием для автоматического подсчета клеток. Записывали количества клеток.

[00904] Повторяли процедуры для всех тестируемых лотов питающих клеток.

Результаты и критерии приемлемости

Результаты

[00905] Доза гамма-излучения была достаточной для лишения питающих клеток способности к репликации. Ожидалось, что все лоты соответствуют критериям оценки, и также продемонстрируют уменьшение общего количества жизнеспособных питающих клеток, остающихся в день 7 культивирования ПБР, в сравнении с днем 0.

[00906] Ожидалось, что все лоты соответствуют критериям оценки для 100-

кратного увеличения количества ОИЛ к дню 7 культивирования ПБР.

[00907] Ожидалось, что в день 14 питающие клетки в контрольных флаконах продолжат демонстрировать отсутствие пролиферации, наблюдаемое в день 7.

Критерии приемлемости

[00908] Соответствие следующим критериям приемлемости было отмечено у каждой реплицируемой линии ОИЛ, протестированной для каждого лота питающих клеток.

[00909] Приемлемым считали двукратное увеличение количества, как описано далее (представлено ниже в Таблице 27).

ТАБЛИЦА 27: Критерии приемлемости

Тест	Критерии приемлемости
Облучение МК/Неспособность репликации	Рост отсутствует в дни 7 и 14
Размножение ОИЛ	По меньшей мере 100-кратное увеличение количества каждой линии ОИЛ (минимум $1,3 \times 10^7$ жизнеспособных клеток)

[00910] Оценивали, являлась ли доза радиации достаточной для лишения питающих клеток МК способности к репликации при культивировании в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2. Неспособность к репликации оценивали путем подсчета общего количества жизнеспособных клеток (ОКЖК) с использованием автоматического счетчика клеток в день 7 и день 14 ПБР.

[00911] Критерием приемлемости являлось «отсутствие роста», это означало, что количество жизнеспособных клеток не увеличилось в день 7 и день 14 в сравнении с исходным количеством жизнеспособных клеток в день 0 ПБР.

[00912] Оценивали способность питающих клеток обеспечивать размножение ОИЛ. Рост ОИЛ измеряли на основании кратности увеличения количества жизнеспособных клеток с момента начала культивирования в день 0 ПБР до дня 7 ПБР. В день 7 для культур ОИЛ наблюдали минимум 100-кратное увеличение количества (то есть, более чем 100-кратное увеличение общего количества жизнеспособных клеток ОИЛ в сравнении с началом культивирования ПБР в день 0), при оценке с использованием автоматического счетчика клеток.

Экстренное тестирование лотов питающих клеток МК, не соответствующих критериям приемлемости

[00913] В случае, если лот питающих клеток МК не соответствовал какому-либо из критериев приемлемости, приведенных выше, проводили следующие этапы для повторного тестирования лота с целью исключения вероятности того, что причиной является простая ошибка эксперимента.

[00914] Если имелись два или более отдельных тестируемых флаконов из лота,

тогда лот тестировали повторно. Если оставался один, или не оставалось ни одного, из тестируемых флаконов из лота, тогда считали, что лот не соответствовал критериям приемлемости, приведенным выше.

[00915] Для признания лота удовлетворительным, сомнительный лот и контрольный лот должны были соответствовать критериям приемлемости, описанным выше. В случае соответствия критериям лот был допущен для последующего использования.

Пример 10: Оценка на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови

[00916] В данном примере описан новый сокращенный способ оценки на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) для использования в качестве аллогенных питающих клеток в иллюстративных способах, описанных в настоящем документе. В данном примере описан протокол оценки лотов облученных клеток МКПК, предназначенных для использования в получении клинических лотов ОИЛ. Каждый лот облученных МКПК получали от отдельного донора. При выполнении более 100 протоколов оценки на соответствие было показано, что во всех случаях лоты облученных МКПК из SDBB (банк крови Сан-Диего) обеспечивали >100-кратное увеличение количества ОИЛ в день 7 ПБР. Этот модифицированный протокол оценки на соответствие был запланирован для применения к лотам облученных донорских МКПК из SDBB, которые впоследствии тестировали для подтверждения того, что полученная доза гамма-излучения являлась достаточной для лишения клеток способности к репликации. После установления того, что неспособность к репликации сохраняется у клеток на протяжении 14 дней, лоты донорских МКПК считали «соответствующими требованиям» для использования в получении клинических лотов ОИЛ.

Вводная информация

[00917] Гамма-облученные, остановленные в росте питающие МК были необходимы для современного стандартного ПБР ОИЛ. Мембранные рецепторы на питающих МК связывают анти-CD3 (клон ОКТ3) антитело и перекрестно связываются с ОИЛ во флаконе ПБР, стимулируя ОИЛ к размножению. Лоты питающих клеток получали путем лейкофереза цельной крови от отдельных доноров. Лейкоферезный препарат центрифугировали в градиенте плотности фиколл-пак, промывали, облучали и криоконсервировали в условиях GMP.

[00918] Важно, чтобы пациентам, получающим ОИЛ-терапию, не были введены инфузией жизнеспособные питающие клетки, поскольку это может приводить к развитию реакции трансплантат против хозяина (GVHD). Вследствие этого рост питающих клеток останавливают, подвергая клетки воздействию гамма-излучения, что приводит к разрывам в двухцепочечной ДНК и потере жизнеспособности МК при повторном культивировании.

Критерии оценки

[00919] Критерием оценки для лотов облученных МКПК являлось отсутствие у них

способности к репликации.

Дизайн эксперимента

[00920] Лоты питающих клеток тестировали в формате мини-ПБР, как если бы их совместно культивировали с ОИЛ, используя флаконы для культивирования тканей T25 в вертикальном положении. Контрольный лот: один лот облученных МКПК, который, как уже было показано, соответствовал критерию, приведенному выше, тестировали наряду с экспериментальными лотами в качестве контроля. Для каждого тестируемого лота облученных донорских МКПК использовали флаконы-дубликаты.

Протокол эксперимента

День 0

[00921] Готовили ~90 мл среды CM2 для каждого тестируемого лота донорских МКПК. Поддерживали CM2 теплой в водяной бане с температурой 37°C. Размораживали аликвоту 6×10^6 МЕ/мл IL-2. Возвращали среду CM2 в БББ, протирали 70% EtOH перед помещением в ламинарный шкаф. Для каждого тестируемого лота МКПК отбирали примерно 60 мл CM2 в отдельный стерильный флакон. Добавляли IL-2 из размороженного 6×10^6 МЕ/мл маточного раствора в данную среду до конечной концентрации 3000 МЕ/мл. Маркировали этот флакон как «CM2/IL2» (или аналогичным образом), чтобы отличать среду от CM2 без добавок.

Подготовка ОКТ3

[00922] Извлекали маточный раствор анти-CD3 (ОКТ3) из холодильника с температурой 4°C и помещали в БББ. Использовали конечную концентрацию 30 нг/мл ОКТ3 в среде для мини-ПБР. Готовили 10 мкг/мл рабочий раствор анти-CD3 (ОКТ3) из 1 мг/мл маточного раствора. Помещали в холодильник до использования.

[00923] Для каждого тестируемого лота МКПК готовили 150 мкл анти-CD3 (ОКТ3), разведенного 1:100 из маточного раствора. Например, для одновременного тестирования 4 лотов МКПК готовили 600 мкл анти-CD3 (ОКТ3) с концентрацией 10 мкг/мл путем добавления 6 мкл 1 мг/мл маточного раствора к 594 мкл CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2.

Подготовка флаконов

[00924] Добавляли 19 мл на флакон CM2/IL-2 в маркированные флаконы T25 и помещали флаконы в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO₂ на время подготовки клеток.

Подготовка облученных МКПК

[00925] Извлекали флаконы с тестируемыми лотами МКПК из хранилища с LN₂. Помещали их на -80°C или хранили на сухом льду до размораживания. Помещали 30 мл CM2 (без IL-2) в 50-мл конические пробирки для каждого размораживаемого лота. Маркировали каждую пробирку разными номерами лотов размораживаемых МКПК. Плотнo закрывали пробирки и помещали в водяную баню с температурой 37°C до использования. По мере необходимости, возвращали 50-мл конические пробирки в БББ, протирая 70% EtOH перед помещением в ламинарный шкаф.

[00926] Извлекали флакон с МКПК из холодного хранилища и помещали в плавающий штатив для пробирок в водяной бане с температурой 37°C для размораживания. Оставляли размораживаться до тех пор, пока во флаконе не оставался небольшой кусок льда. Используя стерильную пипетку для переноса, немедленно переносили содержимое флакона в 30 мл СМ2 в 50-мл конической пробирке. Отбирали примерно 1 мл среды из пробирки для промывания флакона; возвращали смыв в 50-мл коническую пробирку. Плотно закрывали и осторожно вращали, промывая клетки.

[00927] Центрифугировали при 400xg в течение 5 мин при комнатной температуре. Удаляли аспирацией супернатант и ресуспендировали клеточный осадок в 1 мл теплой СМ2/IL-2, используя 1000-мкл пипетку с наконечником. Альтернативно, перед добавлением среды ресуспендировали клеточный осадок путем протаскивания закрытой пробирки вдоль пустого штатива для пробирок. После ресуспендирования клеточного осадка доводили объем до 4 мл средой СМ2/IL-2. Записывали объем.

[00928] Отбирали небольшую аликвоту (например, 100 мкл) для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Выполняли подсчет клеток в двух повторах в соответствии с СОП для конкретного автоматического счетчика клеток. Чаще всего было необходимо разбавлять МКПК перед проведением подсчета клеток. Рекомендованное начальное разведение составляло 1:10, однако оно варьировалось в зависимости от типа используемого счетчика клеток. Записывали количества клеток.

[00929] Доводили концентрацию МКПК до $1,3 \times 10^7$ клеток/мл, используя среду СМ2/IL-2. Тщательно перемешивали, осторожно вращая или осторожно отбирая и выпуская жидкость серологической пипеткой.

Подготовка флаконов для культивирования

[00930] Возвращали два маркированных флакона Т25 в БББ из инкубатора для культивирования тканей. Возвращали флакон анти-CD3/ОКТ3 с концентрацией 10 мкг/мл в БББ. Добавляли 1 мл клеточной суспензии МКПК в концентрации $1,3 \times 10^7$ в каждый флакон. Добавляли 60 мкл 10 мкг/мл анти-CD3/ОКТ3 в каждый флакон. Возвращали закрытые флаконы в инкубатор для культивирования тканей на 14 дней непотревоженного роста. Помещали флакон с анти-CD3/ОКТ3 обратно в холодильник до работы со следующим лотом. Повторяли процедуру для каждого оцениваемого лота МКПК.

День 14, определение отсутствия пролиферации МКПК

[00931] Возвращали флаконы-дубликаты Т25 в БББ. Используя для каждого флакона свежую 10-мл серологическую пипетку, отбирали ~17 мл из каждого флакона, затем осторожно отбирали оставшуюся среду для измерения остаточного объема во флаконах. Записывали объем.

[00932] Тщательно перемешивали образец пипетированием вверх-вниз, используя ту же серологическую пипетку.

[00933] Отбирали 200-мкл образец из каждого флакона для подсчета клеток. Подсчитывали клетки при помощи автоматического счетчика клеток. Повторяли процедуру для каждого оцениваемого лота МКПК.

Результаты и критерии приемлемости

Результаты

[00934] Ожидалось, что доза гамма-излучения достаточна для лишения питающих клеток способности к репликации. Ожидалось, что все лоты соответствуют критериям оценки, и также продемонстрируют уменьшение общего количества жизнеспособных питающих клеток, остающихся в день 14 культивирования ПБР, в сравнении с днем 0.

Критерии приемлемости

[00935] Соответствие следующим критериям приемлемости было отмечено для каждого протестированного лота облученных донорских МКПК: «Отсутствие роста» - означало, что общее количество жизнеспособных клеток в день 14 было меньшим, чем количество жизнеспособных клеток в момент начала культивирования в день 0 ПБР.

Экстренное тестирование лотов МКПК, не соответствующих критериям приемлемости

[00936] В случае, если лот облученных донорских МКПК не соответствовал критериям приемлемости, приведенным выше, проводили следующие этапы для повторного тестирования лота с целью исключения вероятности того, что причиной является простая ошибка эксперимента. Если имелись два или более отдельных тестируемых флаконов из лота, тогда лот тестировали повторно. Если оставался один, или не оставалось ни одного, из тестируемых флаконов из лота, тогда считали, что лот не соответствовал критериям приемлемости, приведенным выше.

[00937] Чтобы выдержать проверку на соответствие критериям, для лота МКПК, подвергаемого экстренному тестированию, было необходимо, чтобы как контрольный лот, так и обе реплики сомнительного лота, соответствовали критериям приемлемости. В случае соответствия критериям лот затем передавали для дальнейшего использования.

Пример 11: Приготовление маточного раствора IL-2

[00938] В данном примере описан процесс растворения очищенного лиофилизированного рекомбинантного человеческого интерлейкина-2 в маточные образцы, подходящие для использования в последующих протоколах культивирования клеток, в том числе тех, которые описаны в настоящей заявке и в примерах, включая те, в которых используют rhIL-2.

Процедура

[00939] Готовили 0,2% раствор уксусной кислоты (НАс). Переносили 29 мл стерильной воды в 50-мл коническую пробирку. Добавляли 1 мл 1Н уксусной кислоты в 50-мл коническую пробирку. Тщательно перемешивали, переворачивая пробирку 2-3 раза. Стерилизовали раствор НАс фильтрованием, используя фильтр Steriflip.

[00940] Готовили 1% раствор ЧСА в PBS. Добавляли 4 мл 25% маточного раствора ЧСА к 96 мл PBS в 150-мл стерильной фильтровальной ячейке. Фильтровали раствор. Для каждого приготовленного флакона rhIL-2 заполняли формы.

[00941] Готовили маточный раствор rhIL-2 (конечная концентрация 6×10^6 МЕ/мл). Все лоты rhIL-2 являлись разными, и для них было необходимо находить информацию в

подготовленном производителем сертификате анализа (СОА), такую как: 1) масса rhIL-2 в каждом флаконе (мг), 2) удельная активность rhIL-2 (МЕ/мг) и 3) рекомендованный объем для восстановления 0,2% НАс (мл).

[00942] Рассчитывали объем 1% ЧСА, необходимый для лота rhIL-2, используя приведенную ниже формулу:

$$\left(\frac{\text{Масса флакона (мг)} \times \text{Биологическая активность} \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{МГ}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}}} \right) - \text{НАс об. (мл)} = 1\% \text{ ЧСА об. (мл)}$$

[00943] Например, в соответствии с СОА лота 10200121 rhIL-2 CellGenix, удельная активность для 1-мг флакона составляет 25×10^6 МЕ/мг. Рекомендовано восстанавливать rhIL-2 в 2 мл 0,2% НАс.

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

[00944] Протирали пробку флакона с IL-2 спиртовой салфеткой. Используя иглу 16G, прикрепленную к 3-мл шприцу, инъецировали рекомендованный объем 0,2% НАс во флакон. Проявляли осторожность, чтобы не сдвигать пробку при извлечении иглы. Переворачивали флакон 3 раза и вращали до полного растворения порошка. Осторожно вынимали пробку и откладывали в сторону на спиртовую салфетку. Добавляли рассчитанный объем 1% ЧСА во флакон.

[00945] Хранение раствора rhIL-2. Для краткосрочного хранения (<72 часов) хранили флакон при 4°C. Для долгосрочного хранения (>72 часов) разделяли содержимое флакона на аликвоты более мелкого объема и хранили в криопробирках при -20°C до использования. Избегали циклов замораживания/размораживания. Срок годности составлял 6 месяцев с даты изготовления. Экетки для rh-IL-2 включали название поставщика и каталожный номер, номер лота, срок годности, инициалы оператора, концентрацию и объем аликвоты.

Пример 12: Приготовление среды для процессов пре-ПБР и ПБР

[00946] В данном примере описана процедура приготовления среды для культивирования тканей, предназначенной для использования в протоколах, включающих культивирование опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), полученных из опухолей различных типов, включая, но без ограничения, метастатическую меланому, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКГШ), карциному яичника, трижды негативную карциному молочной железы и аденокарциному легкого. Эту среду можно использовать для получения любых ОИЛ, описанных в настоящей заявке и примерах.

Приготовление СМ1

[00947] Извлекали следующие реагенты из холодного хранилища и нагревали их в водяной бане с температурой 37°C: (RPMI 1640, человеческая АВ сыворотка, 200 мМ L-глутамин). Готовили среду СМ1 в соответствии с Таблицей 28, ниже, добавляя каждый из

ингредиентов в верхнюю камеру 0,2-мкм фильтровальной ячейки в соответствующем объеме для фильтрации. Хранили при 4°C.

ТАБЛИЦА 28: Приготовление СМ1

Ингредиент	Конечная концентрация	Конечный объем 500 мл	Конечный объем 1 л
RPMI 1640	Н/П	450 мл	900 мл
Человеческая сыворотка, инактивированная нагреванием, 10%	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ ВМЕ	55 мкМ	0,5 мл	1 мл
50 мг/мл гентамицин сульфат	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

[00948] В день использования предварительно нагревали нужное количество СМ1 в водяной бане с температурой 37°C и добавляли 6000 МЕ/мл IL-2.

[00949] Дополнительные добавки - по мере необходимости в соответствии с Таблицей 29.

ТАБЛИЦА 29: Дополнительные добавки в СМ1, по мере необходимости.

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

Приготовление СМ2

[00950] Извлекали готовую СМ1 из холодильника или готовили свежую СМ1, как описано в разделе 7.3, выше. Извлекали AIM-V из холодильника и готовили необходимое количество СМ2 путем смешивания готовой СМ1 с равным объемом AIM-V в стерильном флаконе для среды. Добавляли 3000 МЕ/мл IL-2 к среде СМ2 в день использования. Готовили достаточное количество СМ2 с 3000 МЕ/мл IL-2 в день использования. Записывали на этикетке флакона со средой СМ2 ее название, инициалы приготовившего ее сотрудника, дату фильтрации/приготовления, двухнедельный срок годности, и хранили при 4°C до использования в культивировании тканей.

Приготовление СМЗ

[00951] Готовили СМЗ в день, когда она должна быть использована. СМЗ представляла собой среду AIM-V с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 в день использования. Готовили количество СМЗ, достаточное для эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 непосредственно во флакон или мешок с AIM-V. Тщательно перемешивали осторожным встряхиванием. Записывали на этикетке флакона «3000 МЕ/мл IL-2» сразу после его добавления в AIM-V. Если оставалась лишняя СМЗ, ее хранили во флаконах при 4°C с этикеткой, на которой указано название среды, инициалы приготовившего ее сотрудника, дата приготовления среды и срок годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среду с добавленным IL-2 после 7 дней хранения при 4°C.

Приготовление СМ4

[00952] СМ4 представляла собой СМЗ с дополнительной добавкой 2 мМ GlutaMAX™ (конечная концентрация). Для каждого 1 л СМЗ добавляли 10 мл 200 мМ GlutaMAX™. Готовили количество СМ4, достаточное для эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 и маточного раствора GlutaMAX™ непосредственно во флакон или мешок с AIM-V. Тщательно перемешивали осторожным встряхиванием. Записывали на этикетке флакона «3000 МЕ/мл IL-2 и GlutaMAX» сразу после добавления к AIM-V. Если оставалась лишняя СМ4, ее хранили во флаконах при 4°C с этикеткой, на которой указано название среды, «GlutaMAX», и срок годности (7 дней после приготовления). Выбрасывали среду с добавленным IL-2 после 7 дней хранения при 4°C.

[00953]

Пример 13: Оценка бессывороточной среды для использования в способе 2А

[00954] В данном примере приведены результаты оценки эффективности бессывороточной среды в качестве замены стандартных сред СМ1, СМ2 и СМ4, в настоящее время используемых в способе 2А. В данном исследовании была протестирована эффективность доступной бессывороточной среды (БСС) и бессывороточных альтернативных сред в качестве замены в трех фазах;

[00955] Фаза-1: определяли эффективность размножения ОИЛ (n=3) при использовании стандартной среды в сравнении с бессывороточной средой CTS Optimizer или Prime T CDM, или Xvivo-20, с добавлением, или без добавления заменителя сыворотки или лизата тромбоцитов.

[00956] Фаза-2: тестировали использование бессывороточной среды - кандидата в мелкомасштабном способе 2А с использованием G-Rex 5M (n=3).

Вводная информация

[00957] Хотя доказано, что сочетание сред, используемое в настоящее время в пре- и пост-ПБР культивировании, является эффективным, при использовании AIM-V могут случаться неудачи с ПБР. В случае обнаружения эффективной бессывороточной альтернативной среды способ мог бы стать более предсказуемым и простым для использования в КОП за счет уменьшения количества видов используемых сред, с 3 до 1. Кроме того, БСС позволяет снизить вероятность побочных заболеваний за счет отказа от

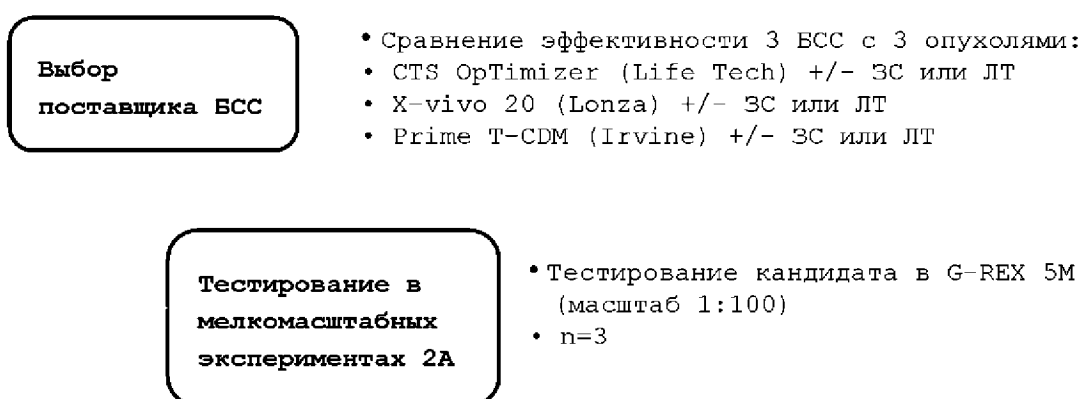
использования человеческой сыворотки. В данном примере приведены результаты, свидетельствующие в пользу использования бессывороточной среды в способе 2А.

ТАБЛИЦА 30: Сокращения

мкл	микролитр
CM1, 2, 4	полная среда 1, 2, 4
БСС CTS OpTimizer	бессывороточная среда Cell Therapy System OpTimizer
г	грамм
ч	час
ИПП	инструкции по применению
IL-2	цитокин интерлейкин-2
мин	минута
мл	миллилитр
°C	градусы Цельсия
пре-ПБР	процесс до протокола быстрого размножения
ПБР	протокол быстрого размножения
RT	комнатная температура
ЗС	заменитель сыворотки
ОИЛ	опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

Дизайн эксперимента

[00958] Пре-ПБР и ПБР начинали, как описано в LAB-008. Обзор трех фаз эксперимента приведен на схеме, ниже:



[00959] Как показано на схеме, начинали проект для тестирования бессывороточных сред и добавок в два этапа.

[00960] Этап 1. Выбор поставщика бессывороточной среды. Организовали пре-ПБР и пост-ПБР для имитации способа 2А в 24-луночном планшете G-Rex. Пре-ПБР начинали путем культивирования каждого фрагмента/луноку 24-луночного планшета G-Rex в трех

повторах или четырех повторах для каждого варианта. ПБР начинали в день 11 путем культивирования 4×10^5 ОИЛ/лунку 24-луночного планшета G-Rex, разделяли в день 16, собирали клетки в день 22. CTS OpTimizer, X-Vivo 20 и Prime T-CDM использовали в качестве потенциальных альтернативных бессывороточных сред для использования в пре-ПБР и ПБР. Заменитель сыворотки CTS Immune (Life Technologies) или лизат тромбоцитов (SDBB) добавляли в концентрации 3% к БСС. Для каждого варианта было запланировано тестирование по меньшей мере 3 опухолей как в пре-ПБР, так и в пост-ПБР для имитации способа 2А.

[00961] Этап 2. Идентифицированных кандидатов дополнительно тестировали в мелкомасштабном способе 2А в соответствии с протоколом (TP-17-007). Вкратце, пре-ПБР начинали путем культивирования 2 фрагментов/флакон G-Rex 5М в трех повторах для каждого варианта. ПБР начинали в день 11 с использованием 2×10^6 /флакон G-Rex 5М, разделяли в день 16, собирали клетки в день 22.

[00962] **Примечание:** несколько опухолей обрабатывали и использовали для измерения нескольких параметров в одном эксперименте.

Наблюдения

[00963] Наблюдали эквивалентные или статистически достоверно лучшие результаты роста клеток при сравнении бессывороточных сред со стандартной средой, используемой в способе 2А.

[00964] Наблюдали аналогичный фенотип, продуцирование IFN- γ и результаты анализа метаболитов для ОИЛ, растущих в бессывороточной среде, в сравнении с ОИЛ, растущими в стандартной среде, используемой в способе 2А.

Результаты

Тестирование эффективности бессывороточной среды для размножения пре- и пост-ПБР ОИЛ.

[00965] **CTS Optimizer+3С (заменитель сыворотки) показала лучшие результаты при размножении пре-ПБР ОИЛ и сопоставимые результаты при размножении ПБР ОИЛ.** CTS OpTimizer, X-Vivo 20 и Prime T-CDM, с добавлением, или без добавления, 3% 3С CTS Immune CTS, тестировали в сравнении со стандартным вариантом. В случае M1079 и L4026 с вариантом CTS OpTimizer+3С наблюдали значительно увеличенное размножение пре-ПБР ОИЛ ($p < 0,05$) в сравнении со стандартным вариантом (СМ1, СМ2, СМ4). Напротив, вариант CTS Optimizer без 3С не способствовал размножению пре-ПБР ОИЛ (Приложение 1, 2, 3). В случае варианта CTS Optimizer+3С наблюдали сопоставимое размножение ОИЛ в пост-ПБР для двух из 3 протестированных опухолей (Фигура 2В). Большое количество вариаций наблюдали в пре- и пост-ПБР при использовании вариантов X-Vivo 20 и Prime T-CDM, в то время как результаты для CTS Optimizer были относительно постоянными в четырех повторах образцов. Кроме того, добавление в БСС лизата тромбоцитов не приводило к увеличению размножения пре-ПБР и пост-ПБР ОИЛ в сравнении со стандартными вариантами. Эти результаты свидетельствуют о том, что заменитель сыворотки действительно необходим

для обеспечения роста, сопоставимого с ростом в стандартных условиях, и CTS optimizer+3C может являться подходящим кандидатом.

[00966] Тестирование варианта-кандидата в мелком масштабе с использованием G-Rex 5M.

[00967] Фенотипический анализ пост-ПБР ОИЛ. Смотри Таблицу 31, ниже.

Таблица 31: CD8 сдвиг с CTS OpTimizer

	Средний % CD8+	
	Стандартная среда	CTS
M1078	11	34
M1079	29,3	43,85
M1080	33,67	54,37
L4020	0,02	0,17
EP11020	28,67	25,07
L4030	0,13	0,09
L4026	9,45	34,06
M1092	5,75	52,47
T6030	66	52,6

[00968] Сопоставимость продуцирования интерферона-гамма

[00969] ELISA для интерферона-гамма (Quantikine). Продуцирование IFN- γ измеряли с использованием набора Quantikine ELISA от компании R&D systems. Вариант CTS+3C приводил к продуцированию сопоставимых количеств IFN- γ в сравнении со стандартным вариантом авторов изобретения.

Пример 14: Коктейль факторов роста Т-клеток IL-2/IL-15/IL-21 приводит к увеличению размножения и эффекторной функции опухоль-инфильтрирующих Т-клеток

[00970] Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) продемонстрировала клиническую эффективность у пациентов с метастатической меланомой и карциномой шейки матки. В некоторых исследованиях лучшие клинические результаты положительно коррелировали с общим количеством введенных инфузией клеток и/или процентным содержанием CD8+ Т-клеток. В большинстве современных способов производства используют исключительно IL-2 для стимуляции роста ОИЛ. Сообщалось об увеличении размножения лимфоцитов при использовании режимов с добавлением IL-15 и IL-21. В данном примере описаны положительные эффекты добавления IL-15 и IL-21 в протоколе второго поколения IL-2-ОИЛ, недавно внедренном в клиническую практику.

Материалы и методы

[00971] Способ получения ОИЛ включает предварительный период до протокола быстрого размножения (пре-ПБР), в котором опухолевые фрагменты размером 1-3 мм³

помещают в среду, содержащую ИЛ-2. В процессе пре-ПБР ОИЛ выходят из опухолевых фрагментов и размножаются в ответ на стимуляцию ИЛ-2.

[00972] Для дополнительной стимуляции роста ОИЛ клетки размножают во втором периоде культивирования, называемом протоколом быстрого размножения (ПБР), во время которого добавляют облученные питающие клетки МКПК, ИЛ-2 и анти-CD3. В данном исследовании был разработан сокращенный протокол размножения пре-ПБР и ПБР для размножения ОИЛ, с сохранением фенотипических и функциональных характеристик конечного препарата ОИЛ.

[00973] Этот сокращенный протокол получения ОИЛ использовали для оценки влияния только одного ИЛ-2 в сравнении с сочетанием ИЛ2/ИЛ-15/ИЛ-21. Эти два режима культивирования сравнивали в процессе размножения ОИЛ, растущих из опухолей колоректального рака, меланомы, рака шейки матки, трижды негативного рака молочной железы, рака легкого и рака почки. После завершения пре-ПБР культивируемые ОИЛ оценивали в отношении размножения, фенотипа, функции (CD107a+ и IFN γ) и репертуара TCR V β .

[00974] Пре-ПБР культивирование начинали с использованием стандартного протокола с ИЛ-2 (600 МЕ/мл), или с ИЛ-15 (180 МЕ/мл) и ИЛ-21 (1 МЕ/мл) в дополнение к ИЛ-2. Клетки оценивали в отношении размножения после завершения пре-ПБР. Считали, что в культуре имеет место усиленное размножение в сравнении с использованием ИЛ-2, если общий рост увеличивался по меньшей мере на 20%. Фенотипические и функциональные исследования для меланомы и опухоли легкого приведены в настоящем документе. См. Таблицу 32, ниже.

ТАБЛИЦА 32: Увеличение размножения в процессе пре-ПБР при добавлении ИЛ-2/ИЛ-15/ИЛ-21 в случае нескольких опухолей

Гистология опухоли	Кол-во исследований ИЛ-2 в сравнении с ИЛ-2/ИЛ-15/ИЛ-21	Кол-во исследований, в которых отмечено увеличение на >20% роста клеток при использовании ИЛ-2/ИЛ-15/ИЛ-21 (в сравнении с ИЛ-2)
Меланома	5	1/5(20%)
Рак легкого	8	3/8 (38%)
Колоректальный рак	11	7/11 (63%)
Рак шейки матки	1	1/1 (100%)
Рак поджелудочной железы	2	2/2 (100%)

Глиобластома	1	1/1 (100%)
Трижды негативный рак молочной железы	1	1/2 (50%)

[00975] Эти данные показывают увеличение выхода препарата ОИЛ в случае культивирования ОИЛ с IL-2/IL15/IL-21 в сравнении с использованием только IL-2, в дополнение к фенотипическим и функциональным отличиям для легкого.

[00976] Эффект тройного коктейля на размножение ОИЛ был специфическим для вида опухоли, и наиболее благоприятный эффект был отмечен для опухолей, отличающихся самым низким выходом.

[00977] Соотношение CD8+/CD4+ Т-клеток увеличивалось при использовании коктейля в препарате ОИЛ НМРЛ.

[00978] Т-клеточная активность, судя по всему, увеличивалась при добавлении IL-15 и IL-21 к IL-2, при оценке на основании уровней экспрессии CD107a, как в случае меланомы, так и НМРЛ.

[00979] Данные, приведенные в настоящем документе, показывают, что размножение ОИЛ с использованием более короткого, более надежного способа, такого как способ 2А, описанный в настоящем документе, в заявке и других примерах, может быть адаптировано для использования коктейля цитокинов IL-2/IL-15/IL-21, что способствует дополнительной стимуляции размножения ОИЛ, особенно для конкретных опухолей.

[00980] В текущих экспериментах дополнительно оценивают эффекты IL-2/IL-15/IL-21 на функцию ОИЛ.

[00981] В дополнительных экспериментах будет оценен эффект тройного коктейля в процессе ПБР (первое размножение).

[00982] Эти наблюдения особенно важны для оптимизации и стандартизации режимов культивирования ОИЛ, что необходимо для крупномасштабного производства ОИЛ с широкой доступностью и применимостью, которые необходимы для масштабной противораковой терапии.

Пример 15: Оценка диапазона соотношений от 100:1 до 25:1 аллогенных питающих клеток и ОИЛ

[00983] В данном исследовании тестировали пролиферацию ОИЛ при соотношениях 25:1 и 50:1 аллогенных питающих клеток и ОИЛ, в сравнении с контрольным соотношением 100:1, в настоящее время используемым в способе 1С.

[00984] Исследования, опубликованные хирургическим отделением Национального института рака, установили порог для оптимальной активации ОИЛ во флаконе G-REX 100, соответствующий 5×10^6 аллогенных питающих клеток на см^2 при инициации ПБР⁽¹⁾. Это было проверено с помощью математического моделирования и, с той же моделью, предсказано, что с фидерным слоем, оптимизированным для межклеточных контактов на единицу площади, пропорция аллогенных питающих клеток относительно ОИЛ может

быть уменьшена до 25:1 с минимальным эффектом на активацию и размножение ОИЛ.

[00985] В данном исследовании устанавливали оптимальную плотность питающих клеток на единицу площади при инициации ПБР, и проверяли эффективный диапазон соотношений для аллогенных питающих клеток при инициации ПБР с целью снижения и нормирования количества питающих клеток, используемого на клинический лот. В исследовании также проверяли возможность инициации ПБР с менее чем 200×10^6 ОИЛ, совместно культивируемых с фиксированным количеством питающих клеток.

[00986] А. Объем Т-клетки (диаметр 10 мкм): $V = (4/3) \pi r^3 = 523,6 \text{ мкм}^3$

[00987] В. Колонка G-REX 100 (M) с 40-мкм (4 клетки) высотой: $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \text{ мкм}^3$

[00988] С. Количество клеток, необходимое для заполнения колонки В: $4 \times 10^{12} \text{ мкм}^3 / 523,6 \text{ мкм}^3 = 7,6 \times 10^8 \text{ мкм}^3 * 0,64 = 4,86 \times 10^8$

[00989] D. Количество клеток, которое может быть оптимально активировано в 4D пространстве: $4,86 \times 10^8 / 24 = 20,25 \times 10^6$

[00990] E. Количество питающих клеток и ОИЛ, экстраполированное на G-Rex 500: ОИЛ: 100×10^6 и питающих клеток: $2,5 \times 10^9$.

[00991] Уравнение 1. Аппроксимация количества моноклеарных клеток, необходимого для обеспечения икосаэдрической геометрии для активации ОИЛ в цилиндре с основанием 100 см^2 . При расчетах получен экспериментальный результат $\sim 5 \times 10^8$ для пороговой активации Т-клеток, который точно отражает экспериментальные данные NCI⁽¹⁾. (C) Множитель (0,64) представляет собой случайную плотность упаковки для эквивалентных сфер, рассчитанную Jaeger and Nagel в 1992 г.⁽²⁾. (D) Делитель 24 представляет собой число эквивалентных сфер, с которыми может контактировать аналогичный объект в 4-мерном пространстве «число Ньютона»⁽³⁾.

Литература

[00992] ⁽¹⁾ Jin, Jianjian, et. al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.

[00993] ⁽²⁾ Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[00994] ⁽³⁾ O. R. Musin (2003). «The problem of the twenty-five spheres». Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

Пример 16: Получение криоконсервированных терапевтических клеток ОИЛ с использованием закрытой системы

[00995] В данных примерах описан процесс производства в условиях cGMP компанией Iovance Biotherapeutics, Inc. терапевтических клеток ОИЛ во флаконах G-Rex в соответствии с современными требованиями надлежащей практики культивирования тканей и современными требованиями надлежащей производственной практики. Данный материал будет произведен в соответствии с требованиями надлежащей производственной практики FDA США (21 CFR части 210, 211, 1270 и 1271), и применимыми стандартами

ICH Q7 для фазы I производства коммерческих материалов.

[00996] Краткое описание способа приведено в Таблице 33, ниже.

ТАБЛИЦА 33: Краткое описание способа

Расчетный день (после высевания)	Действия	Целевой критерий	Предполагаемые емкости	Расчетный общий объем (мл)
0	Измельчение опухоли	≤ 50 подходящих опухолевых фрагментов на G-Rex 100MCS	1 флакон G-REX 100MCS	≤ 1000
11	Высевание ПБР	$5-200 \times 10^6$ жизнеспособных клеток на G-Rex 500MCS	1 флакон G-Rex 500MCS	≤ 5000
16	Разделение ПБР	1×10^9 жизнеспособных клеток на G-Rex 500MCS	≤ 5 флаконов G-Rex 500MCS	≤ 25000
22	Сбор клеток	Общее доступное количество клеток	3-4 мешка CS-750	≤ 530

[00997] В данном Примере считают, что 1,0 мл/л=1,0 г/кг, если не указано иначе. После открытия емкостей применимы следующие сроки годности при 2°C - 8°C: человеческая сыворотка, тип АВ (HI) Gemini, 1 месяц; 2-меркаптоэтанол, 1 месяц. Гентамицин сульфат, маточный раствор с концентрацией 50 мг/мл можно хранить при комнатной температуре в течение 1 месяца. Мешки, содержащие 10 л среды AIM-V, можно выдерживать при комнатной температуре только один раз не более чем 24 часа перед использованием. Во время сбора клеток в день 22 можно использовать два Gatherex™ для сбора ОИЛ из флаконов G-Rex 500MCS.

День 0, Приготовление среды СМ1

[00998] Готовили среду RPMI 1640. В БББ, используя пипетку соответствующего размера, отбирали 100,0 мл из 1000 мл среды RPMI 1640 и помещали в контейнер соответствующего размера, маркированный «отходы».

[00999] В БББ добавляли реагенты во флакон со средой RPMI 1640. Во флакон со средой RPMI 1640 добавляли следующие реагенты, приведенные в Таблице. Записывали добавленные объемы. Добавленное количество на флакон: инактивированная нагреванием человеческая АВ сыворотка (100,0 мл); GlutaMax (10,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл); 2-меркаптоэтанол (1,0 мл)

[001000] Закрывали флакон со средой RPMI 1640 и вращали флакон для гарантии тщательного перемешивания реагентов. Фильтровали среду RPMI 1640 из этапа 8.1.6 через 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон. Маркировали фильтрованную среду. Асептически закрывали фильтрованную среду и на этикетке указывали следующую информацию.

[001001] Размораживали одну 1,1-мл аликвоту IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) до полного таяния льда. Записывали для IL-2: № лота и срок годности. Переносили маточный раствор IL-2 в среду. В БББ переносили 1,0 мл маточного раствора IL-2 во флакон со средой CM1, день 0, приготовленной на этапе 8.1.8. Объединяли 1 флакон среды CM1, день 0, и 1,0 мл IL-2 (6×10^6 МЕ/мл). Закрывали и вращали флакон для перемешивания среды, содержащей IL-2. Заново маркировали надписью «полная среда CM1, день 0».

[001002] Используя пипетку соответствующего размера, отбирали 20,0 мл среды и вносили в 50-мл коническую пробирку. В БББ переносили 25,0 мл «полной среды CM1, день 0» (приготовленной на этапе 8.1.13) в 50-мл коническую пробирку. Маркировали пробирку «куски ткани». Асептически переносили G-REX 100MCS (W3013130) в БББ. В БББ закрывали все зажимы на G-REX 100MCS, оставляя зажим вентиляционного фильтра открытым. Соединяли красную линию флакона G-REX 100MCS с большего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом (W3009497) через крепление Люэра. Помещали насос Ваха рядом с БББ. Извлекали секцию трубки насоса из набора для перекачивания жидкости с насосом из БББ и устанавливали в перистальтический насос. В БББ извлекали шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) (W3012720) и выбрасывали.

[001003] Соединяли пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра и помещали наконечник пипетки в «полную среду CM1, день 0» для аспирации. Открывали все зажимы между средой и G-REX 100MCS. Закачивали полную среду CM1 во флакон G-REX 100MCS. Устанавливали скорость насоса на отметку «высокая» и «9», и закачивали всю полную среду CM1, день 0, во флакон G-REX 100MCS. После переноса всей среды очищали линию и останавливали насос.

[001004] Отсоединяли насос от флакона. Убеждались, что все зажимы на флаконе закрыты, кроме вентиляционного фильтра. Отделяли набор для перекачивания жидкости с насосом от красной линии для среды, и надевали красный колпачок (W3012845) на красную линию для среды. Извлекали флакон G-REX 100MCS из БББ, отделяли сваркой красный колпачок от красной линии рядом с креплением Люэра. Маркировали флакон G-REX 100MCS предоставленной отделом ОК относящейся к процессу этикеткой «День 0». Образец этикетки «День 0» приведен ниже. Параметры инкубатора: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процентное содержание CO_2 : $5,0 \pm 1,5\% \text{CO}_2$.

[001005] Помещали 50-мл коническую пробирку в инкубатор на ≥ 30 минут для согревания.

День 0, Приготовление среды для промывания опухоли

[001006] Добавляли гентамицин в HBSS. В БББ добавляли 5,0 мл гентамицина (W3009832 или W3012735) в 1×500 мл флакон со средой HBSS (W3013128). Записывали объемы. Добавляли на флакон: HBSS (500,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (5,0 мл). Тщательно смешивали реагенты. Фильтровали HBSS, содержащий гентамицин, полученный на этапе 8.2.1, через 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон (W1218810). Асептически закрывали фильтрованную среду и на этикетке указывали следующую информацию.

День 0, Обработка опухоли

[001007] Получали образец опухоли и немедленно переносили в комнату с температурой 2°C - 8°C для обработки и записи информации об опухоли. Маркировали три 50-мл конические пробирки: первую «пинцет», вторую «скальпель» и третью «свежая среда для промывания опухоли». Маркировали 5×100 мм чашек Петри: «промывание 1», «промывание 2», «промывание 3», «хранение» и «неподходящие». Маркировали один 6-луночный планшет «подходящие промежуточные фрагменты».

[001008] Используя пипетку соответствующего размера, переносили 5,0 мл «среды для промывания опухоли» в каждую лунку одного 6-луночного планшета для подходящих промежуточных фрагментов опухоли (всего 30,0 мл). Используя пипетку соответствующего размера, переносили 50,0 мл «среды для промывания опухоли», приготовленной на этапе 8.2.4, в каждую из 100-мм чашек Петри «промывание 1», «промывание 2», «промывание 3» и «хранение» (всего 200,0 мл). Используя пипетку соответствующего размера, переносили 20,0 мл «среды для промывания опухоли», приготовленной на этапе 8.2.4, в каждую 50-мл коническую пробирку (всего 60,0 мл). Асептически снимали крышки с двух 6-луночных планшетов. Крышки использовали для выбранных кусков опухоли. Асептически переносили опухоль в БББ. Записывали время начала обработки.

[001009] Промывание опухоли 1: используя пинцет, извлекали опухоль из флакона для образцов и переносили в чашку «промывание 1». Используя пинцет, осторожно промывали опухоль и записывали время. Переносили 20,0 мл (или доступный объем) раствора из флакона с образцом опухоли в 50-мл коническую пробирку в соответствии с планом для образца. Маркировали и хранили образец собранной биомассы при 2-8°C для передачи на тестирование.

[001010] Промывание опухоли 2: используя новые пинцеты, извлекали опухоль из чашки «промывание 1» и переносили в чашку «промывание 2». Используя пинцет, промывали образец опухоли, осторожно покачивая в течение ≥ 3 минут, и давали возможность осесть. Записывали время.

[001011] Используя пипетку для переноса, помещали 4 отдельные капли среды для промывания опухоли из конической пробирки в каждый из 6 кружков на перевернутых крышках 6-луночных планшетов (2 крышки). Помещали дополнительную каплю на два кружка, всего 50 капель.

[001012] Промывание опухоли 3: Используя пинцет, извлекали опухоль из чашки

«промывание 2» и переносили в чашку «промывание 3». Используя пинцет, промывали образец опухоли, осторожно покачивая и давая возможность осесть, в течение ≥ 3 минут. Записывали время.

[001013] Помещали линейку под крышку 150-мм чашки. Используя пинцет, асептически переносили образец опухоли в крышку 150-мм чашки для измельчения. Собирали все куски образца опухоли, соединяя концы с концами, и записывали примерную общую длину и количество фрагментов. Оценивали опухоль на наличие некротической/жировой ткани. Оценивали, является ли $>30\%$ всей площади опухоли некротической и/или жировой тканью; если да, убеждались, что опухоль имеет соответствующий размер, для продолжения обработки. Оценивали, является ли $<30\%$ всей площади опухоли некротической и/или жировой тканью; если да, продолжали процедуру.

[001014] Очистительная обрезка. Если опухоль была большой и $>30\%$ внешней поверхности опухоли выглядели как некротическая/жировая ткань, проводили «очистительную обрезку» путем удаления некротической/жировой ткани, сохраняя при этом внутреннюю структуру опухоли, с использованием сочетания скальпеля и/или пинцета. Для сохранения внутренней структуры опухоли использовали только вертикальное давление при разрезании. Не производили пилящие движения скальпелем.

[001015] Используя сочетание скальпеля и/или пинцета, нарезали образец опухоли на равные фрагменты соответствующего размера (вплоть до 6 промежуточных фрагментов). Для сохранения внутренней структуры опухоли использовали только вертикальное давление при разрезании. Не производили пилящие движения скальпелем. Следили за тем, чтобы не разрезаемые промежуточные фрагменты были полностью погружены в «среду для промывания опухоли». Переносили каждый промежуточный фрагмент в чашку, маркированную «хранение».

[001016] Работая каждый раз с одним промежуточным фрагментом, нарезали промежуточный фрагмент опухоли в чашке для измельчения на куски размером примерно $3 \times 3 \times 3$ мм, оставляя минимальное количество геморрагической, некротической и/или жировой ткани на каждом куске. Для сохранения внутренней структуры опухоли использовали только вертикальное давление при разрезании. Не производили пилящие движения скальпелем.

[001017] Выбирали до восьми (8) кусков опухоли без геморрагической, некротической и/или жировой ткани. Использовали линейку для справки. Продолжали измельчение до получения 8 подходящих кусков или до полного измельчения промежуточного фрагмента. Переносили каждый выбранный кусок в одну из капель «среды для промывания опухоли».

[001018] После выбора (8) кусков из промежуточного фрагмента помещали остатки промежуточного фрагмента в новую одиночную лунку 6-луночного планшета «подходящие промежуточные фрагменты».

[001019] Если оставалась подходящая ткань, выбирали дополнительные подходящие куски опухоли из 6-луночного планшета «подходящие промежуточные

фрагменты», заполняя капли для, в общей сложности, 50 кусков. Записывали общее количество полученных измельченных кусков.

[001020] Извлекали 50-мл коническую пробирку «куски ткани» из инкубатора. Следили, чтобы коническая пробирка согревалась в течение ≥ 30 мин. Переносили 50-мл коническую пробирку «куски ткани» в БББ, принимая меры для сохранения стерильности открытых поверхностей для обработки.

[001021] Используя пипетку для переноса, скальпель, пинцет или их сочетание, переносили выбранные 50 лучших фрагментов опухоли из крышек чашек для подходящих фрагментов в 50-мл коническую пробирку «куски ткани». Если кусок опухоли падал при переносе и оставалась подходящая ткань, добавляли дополнительные куски из лунок с подходящими промежуточными фрагментами опухоли. Записывали количество кусков.

[001022] Извлекали из инкубатора G-REX 100MCS со средой. Асептически переносили флакон G-REX 100MCS в БББ. При переносе флакона не держали его со стороны крышки или дна емкости. Переносили флакон, держа его за боковые поверхности. В БББ поднимали крышку флакона G-REX 100MCS, следя за сохранением стерильности внутренних трубок. Вращали коническую пробирку с кусками опухоли для суспендирования кусков, и быстро выливали содержимое во флакон G-REX 100MCS. Убеждались, что куски опухоли равномерно распределены по всей мембране флакона. Осторожно наклоняли флакон взад-вперед, при необходимости, для гарантии равномерного распределения кусков опухоли. Записывали количество опухолевых фрагментов на нижней мембране емкости, и количество всплывающих фрагментов в емкости. ПРИМЕЧАНИЕ: если количество высевных фрагментов НЕ соответствовало количеству собранных фрагментов, сообщали территориальному менеджменту и документировали этот факт в разделе 10.0.

[001023] Инкубировали G-REX 100MCS в следующих условиях: инкубируемый флакон G-Rex: температура на LED дисплее: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процентное содержание CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ CO_2 . Производили расчеты для определения надлежащего времени для удаления G-REX 100MCS из инкубатора в день 11. Расчеты: время инкубации; нижний предел=время инкубации+252 часа; верхний предел=время инкубации+276 часов.

День 11 - Приготовление среды

[001024] Контролируемый инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процентное содержание CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ CO_2 . Нагревали 3×1000 -мл флакона со средой RPMI 1640 (W3013112) и 3×1000 -мл флакона с AIM-V (W3009501) в инкубаторе в течение ≥ 30 минут. Записывали время. Среда: RPMI 1640 и AIM-V. Оставляли дополнительный 1×1000 -мл флакон со средой AIM-V (W3009501) при комнатной температуре для дальнейшего использования.

[001025] Извлекали среду RPMI 1640 по достижении нужного времени. Записывали время окончания инкубации на этапе 8.4.4. Убеждались, что среда нагревалась в течение ≥ 30 мин. В БББ отбирали 100,0 мл из каждого из трех предварительно нагретых 1000-мл флаконов со средой RPMI 1640 и помещали в

контейнер соответствующего размера, маркированный «отходы». В БББ добавляли следующие реагенты в каждый из трех флаконов со средой RPMI 1640 и записывали объем, добавленный в каждый флакон. Человеческая сыворотка GemCell, инактивированная нагреванием, типа АВ (100,0 мл), GlutaMax (10,0 мл), гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл), 2-меркаптоэтанол (1,0 мл).

[001026] Закрывали флаконы и вращали для тщательного смешивания реагентов. Фильтровали каждый флакон среды через отдельную 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон. Асептически закрывали фильтрованную среду и маркировали каждый флакон «среда СМ1, день 11». Размораживали 3×1,1 мл аликвоты IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) до полного таяния льда. Записывали для IL-2 № лота и срок хранения.

[001027] Извлекали три флакона со средой AIM-V из инкубатора. Записывали время окончания инкубации. Убеждались, что среда нагревалась в течение ≥ 30 мин. Используя микропипетку, добавляли 3,0 мл размороженного IL-2 в один 1-л флакон с предварительно нагретой средой AIM-V. Промывали наконечник микропипетки средой после добавления IL-2. Использовали новый стерильный наконечник микропипетки для каждой аликвоты. Записывали общий добавленный объем. Маркировали флакон «AIM-V, содержащая IL-2». Асептически переносили 10-л мешок Labtainer™ и набор для перекачивания жидкости с насосом в БББ. Закрывали все линии на 10-л мешке Labtainer™. Соединяли большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом со средней канюлей на 10-л мешке Labtainer™ через крепление Люэра.

[001028] Помещали насос Ваха рядом с БББ. Пропускали трубку набора для перекачивания жидкости через насос Ваха. Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9». Извлекали шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) и выбрасывали. Принимали меры для сохранения стерильности пипетки PLDS.

[001029] Соединяли пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра, и помещали наконечник пипетки во флакон со средой AIM-V, содержащей IL-2 (приготовленной на этапе 8.4.13), для аспирации. Открывали все зажимы между флаконом со средой и 10-л мешком Labtainer™.

[001030] Используя PLDS, переносили предварительно нагретую приготовленную среду AIM-V, содержащую IL-2, а также два дополнительных флакона со средой AIM-V в 10-л мешок Labtainer™. Добавляли три флакона фильтрованной среды СМ1, день 11. После добавления последнего флакона очищали линию к мешку. ПРИМЕЧАНИЕ: останавливали насос между добавлениями каждого флакона среды. Удаляли PLDS из набора для перекачивания жидкости, и надевали красный колпачок на наконечник Люэра линии в БББ. Осторожно разминали мешок для перемешивания. Маркировали мешок со средой следующей информацией. Срок годности составлял 24 часа с даты приготовления.

[001031] Соединяли 60-мл шприц с доступной канюлей мешка «полная среда СМ2,

день 11». Отбирали 20,0 мл среды и помещали в 50-мл коническую пробирку. Надевали красный колпачок на канюлю на мешке «полная среда СМ2, день 11». Маркировали и хранили архивный образец среды при 2-8°C до передачи его для тестирования. Отделяли сваркой красный колпачок на линии набора для перекачивания жидкости, близко к красному колпачку. Оставляли набор для перекачивания жидкости на мешке.

[001032] В БББ добавляли 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована «для разведений при подсчете клеток» и номером лота, в четыре 15-мл конические пробирки. Маркировали пробирки номером лота и номером пробирки (1-4). Маркировали 4 криопробирки «питающие клетки» и номером пробирки (1-4). Переносили весь остаток 2-меркаптоэтанола, GlutaMax и человеческой сыворотки из БББ в условия 2-8°C.

[001033] Вне БББ соединяли сваркой 1-л пакет для переноса с набором для перекачивания жидкости, присоединенным к приготовленному мешку «полная среда СМ2, день 11». Маркировали пакет для переноса «среда СМ2 для питающих клеток» и номером лота. Делали отметку на трубке 1-л пакета для переноса на расстоянии нескольких дюймов от мешка. Помещали пустой мешок для переноса на весы чтобы трубки находились на весах до отметки. Тарировали весы и оставляли пустой мешок для переноса на весах.

[001034] Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «средняя» и «4». Закачивали 500,0 ± 5,0 мл «полной среды СМ2, день 11», приготовленной на этапе 8.4.22, в мешок для переноса клеток со средой СМ2. Измеряли массу и записывали объем полной среды СМ2, добавленной в мешок для переноса.

[001035] После заполнения запечатывали термосваркой линию. Отделяли мешок со средой СМ2, день 11, с набором для перекачивания жидкости от мешка для переноса со средой для питающих клеток, с сохраненным сварным швом в сторону 1-л пакета для переноса. Помещали приготовленную «полную среду СМ2, день 11» в инкубатор до использования.

День 11 - Сбор ОИЛ

[001036] Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C; процентное содержание CO₂: 5,0±1,5% CO₂. Проводили проверку на соответствие параметров инкубации перед извлечением G-REX 100MCS из инкубатора. Нижние пределы были такими же, как описано выше.

[001037] Записывали время извлечения из инкубатора. Осторожно извлекали G-REX 100MCS из инкубатора и убеждались, что все зажимы закрыты, кроме большой линии фильтра. Записывали время начала обработки.

[001038] Маркировали 300-мл пакет для переноса «суспензия ОИЛ». Стерильно соединяли сваркой линию переноса суспензии ОИЛ (одну линию) гравитационного фильтра для крови. Помещали 300-мл пакет для переноса на весы и записывали сухую массу. Маркировали 1-л пакет для переноса «супернатант».

[001039] Стерильно соединяли сваркой красную линию для удаления среды из G-REX 100MCS с пакетом для переноса «супернатант». Стерильно соединяли сваркой

прозрачную линию для удаления клеток из G-REX 100MCS с одной из двух игольных линий в верхней части фильтра для крови, соединенного с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ». Помещали G-REX 100MCS слева от GatheRex, а пакеты для переноса «супернатант» и «суспензия ОИЛ» справа.

[001040] Устанавливали красную линию для удаления среды из G-Rex 100MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливали прозрачную линию для сбора клеток из G-REX 100MCS в нижний зажим (маркированный линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Соединяли газовую линию GatheRex со стерильным фильтром флакона G-REX 100MCS. Перед удалением супернатанта из флакона G-REX 100MCS убеждались, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты. Переносили ~900 мл культурального супернатанта из G-REX 100MCS в 1-л пакет для переноса. Визуально инспектировали флакон G-REX 100MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации.

[001041] После удаления супернатанта закрывали все зажимы на красной линии.

[001042] Энергично постукивали по флакону и вращали для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. Инспектировали флакон, чтобы убедиться, что все клетки открепились. ПРИМЕЧАНИЕ: сообщали территориальному менеджменту, если клетки не откреплялись. Наклоняли флакон в сторону от собирающей трубки и позволяли кускам опухоли оседать вдоль края. Медленно наклоняли флакон в сторону собирающей трубки, чтобы куски оставались на противоположной стороне флакона. Если трубка для сбора клеток находится не на стыке стенки и нижней мембраны, постукивания по флакону, с наклоном его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

[001043] Открывали все зажимы, ведущие к пакету для переноса суспензии ОИЛ. Используя GatheRex, переносили суспензию клеток через фильтр для крови в 300-мл пакет для переноса. Продолжали наклонять край до завершения сбора всех клеток и среды. Проверяли мембрану на прикрепленные клетки. Промывали дно G-REX 100MCS. Покрывали ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой. Убеждались, что все зажимы закрыты. Запечатывали термосваркой (в соответствии с примечанием 5.12 к способу) пакет для переноса суспензии ОИЛ как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения. Запечатывали термосваркой пакет для переноса «супернатант». Оставляли достаточную длину линии до сварного шва. Записывали массу пакета для переноса суспензии ОИЛ и рассчитывали объем клеточной суспензии.

[001044] Соединяли сваркой 4” набор для переливания плазмы с пакетом для переноса «супернатант», сохраняя крепление Люэра на 4” наборе для переливания плазмы, и переносили в БББ. Соединяли сваркой 4” набор для переливания плазмы с 300-мл пакетом для переноса «суспензия ОИЛ», сохраняя крепление Люэра на 4” наборе для переливания плазмы, и переносили в БББ.

[001045] Отбирали примерно 20,0 мл супернатанта из 1-л пакета для переноса «супернатант» и помещали в стерильную 50-мл коническую пробирку, маркированную «Вас-Т». Отбирали 1,0-мл образец из 50-мл конической пробирки, маркированной «Вас-Т», используя шприц соответствующего размера, и инокулировали в анаэробный флакон.

[001046] Маркировали 4 криопробирки номером пробирки (1-4). Используя отдельные 3-мл шприцы, отбирали 4х 1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса суспензии ОИЛ с использованием крепления Люэра, и помещали в соответствующие криопробирки. Надевали красный колпачок (W3012845) на линию. Помещали пакет для переноса ОИЛ в инкубатор до использования. Выполняли подсчет клеток и расчеты. Выполняли начальные подсчеты клеток без разведения. Если в разведении не было необходимости, «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

[001047] Записывали результаты подсчета клеток и количества ОИЛ. Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ составляло $<5 \times 10^6$ клеток, переходили к этапу «заполнение G-Rex и высевание, день 11». Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ составляло $>5 \times 10^6$, переходили к этапу «расчеты для проточной цитометрии».

Расчеты для проточной цитометрии

[001048] Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ составляло $\geq 4,0 \times 10^7$, рассчитывали объем для получения $1,0 \times 10^7$ клеток для образца для проточной цитометрии. Общее количество жизнеспособных клеток, необходимое для проточной цитометрии: $1,0 \times 10^7$ клеток. Объем клеток, необходимый для проточной цитометрии: концентрация жизнеспособных клеток, деленная на $1,0 \times 10^7$ клеток.

[001049] Если применимо: пересчитывали общее количество жизнеспособных клеток и объем потока. Рассчитывали оставшееся общее количество жизнеспособных клеток и оставшийся объем после отбора образца для цитометрии, как описано ниже.

Криоконсервирование образца ОИЛ

[001050] Если применимо: рассчитывали объем для криоконсервирования. Рассчитывали объем клеток, необходимый для получения 1×10^7 клеток для криоконсервирования.

ТАБЛИЦА 34: Расчет для криоконсервирования

Общее количество жизнеспособных ОИЛ, необходимое для криоконсервирования	Концентрация жизнеспособных клеток	Объем клеток, необходимый для криоконсервирования $C=A \div B$
A. 1×10^7 клеток	B. клеток/мл	C. мл

[001051] Если применимо: отбирали образец для криоконсервирования. Отбирали рассчитанный объем из пакета для переноса «суспензия ОИЛ». Помещали в коническую пробирку соответствующего размера и маркировали надписью «образец для криоконсервирования 1×10^7 клеток», датой и номером лота. Надевали красный колпачок (W3012845) на пакет для переноса «суспензия ОИЛ».

[001052] Центрифугировали «образец для криоконсервирования 1×10^7 клеток», используя следующие параметры: скорость: 350xg, время: 10:00 минут, температура: окружающей среды, торможение: полное (9); ускорение: полное (9).

[001053] Добавляли CS-10. В БББ асептически удаляли аспирацией супернатант. Осторожно постукивали по дну пробирки для ресуспендирования клеток в оставшейся жидкости. Добавляли CS-10. Медленно добавляли 0,5 мл CS10. Записывали добавленный объем. Флаконы с образцами для криоконсервирования заполняли в объеме ~0,5 мл.

День 11 - Питающие клетки

[001054] Получали 3 мешка питающих клеток с по меньшей мере двумя разными номерами лотов из морозильной камеры с LN₂. Хранили клетки на сухом льду до момента размораживания. Записывали информацию для питающих клеток. Подтверждали, что получены по меньшей мере два лота питающих клеток. Помещали мешки с питающими клетками в индивидуальные пакеты с застежкой-молнией, на основании номера лота, и размораживали в водяной бане с температурой $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ или устройстве CytoTherm в течение ~3-5 минут или до момента исчезновения льда.

[001055] Подготовка набора принадлежностей для питающих клеток. Соединяли сваркой 4S-4M60 с CC2 Cell Connect (W3012820), заменяя одну иглу устройства Cell Connect 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60. Производили сварку по мере необходимости.

[001056] Соединяли пакет для переноса среды. Соединяли сваркой пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток» с креплением Люэра CC2. Мешок будет присоединен к стороне набора принадлежностей при помощи порта для безыгольных инъекций. Переносили конструкцию, содержащую полную среду CM2, день 11, в БББ.

[001057] Объединяли размороженные питающие клетки. В БББ набирали 10 мл воздуха в 100-мл шприц. Использовали его для замены 60-мл шприца на CC2. Протирали каждый порт на мешках с питающими клетками спиртовой салфеткой перед снятием колпачка. Прокалывали три мешка с питающими клетками, используя три иглы CC2. Поддерживали постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Принимали меры, чтобы не проколоть бок порта. Открывали запорный клапан так, чтобы линия от мешков с питающими клетками была открыта, а линия к порту для безыгольных инъекций была закрыта. Набирали содержимое мешков с питающими клетками в шприц. Все три мешка опустошали одновременно. После опустошения мешков с питающими клетками, поддерживая давление в шприце, перекрывали зажимами линию к мешкам с питающими клетками. Не отсоединяли шприц от набора принадлежностей. Записывали общий объем питающих клеток в шприце.

[001058] Добавляли питающие клетки в пакет для переноса. Поворачивали запорный клапан так, чтобы линия к мешку с питающими клетками была закрыта, а линия к пакету для переноса среды была открыта. Убеждались, что зажимы сняты на линии к пакету для переноса среды. Выпускали питающие клетки из шприца в пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток». Отсоединяли зажимами линию к пакету для переноса,

содержащему питающие клетки, и оставляли шприц соединенным с набором принадлежностей. Разминали мешок для перемешивания объединенных питающих клеток в пакете для переноса. Маркировали мешок «суспензия питающих клеток».

[001059] Рассчитывали общий объем суспензии питающих клеток. Отбирали образцы для подсчета клеток. Используя отдельный 3-мл шприц для каждого образца, отбирали 4х 1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса суспензии питающих клеток с использованием порта для безыгольных инъекций. Помещали аликвоты каждого образца в маркированные криопробирки.

[001060] Выполняли подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание 5.14 к способу. Разбавляли образцы для подсчета клеток путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии в 4,5 мл среды AIM-V, маркированной номером лота и надписью «для разведений при подсчете клеток». Это приводило к разведению 1:10.

[001061] Записывали количества клеток и объемы образцов. Если общее количество клеток составляло $<5 \times 10^9$, продолжали процесс. Если общее количество клеток составляло $\geq 5 \times 10^9$, продолжали, как описано выше для более высокого количества клеток. Получали дополнительные питающие клетки по мере необходимости, и добавляли в пакет для переноса, как описано выше. Рассчитывали объем суспензии питающих клеток, который необходим для получения 5×10^9 жизнеспособных питающих клеток. Рассчитывали объем избытка питающих клеток для удаления. Округляли до ближайшего целого числа.

[001062] Удаляли избыток питающих клеток. В новый 100-мл шприц набирали до 10 мл воздуха и соединяли шприц с набором принадлежностей. Открывали линию к пакету для переноса «суспензия питающих клеток». Используя шприц, отбирали рассчитанный объем питающих клеток плюс дополнительные 10,0 мл из пакета для переноса в 100-мл шприц. Закрывали линию к пакету для переноса суспензии питающих клеток после удаления нужного объема питающих клеток. Не удаляли последний шприц. После заполнения шприца заменяли его новым шприцем. Можно использовать несколько шприцев для удаления всего объема. С каждым новым шприцем впускали вовнутрь 10 мл воздуха. Записывали общий объем (включая дополнительные 10 мл) удаленных питающих клеток.

[001063] Добавляли ОКТЗ. В БББ, используя 1,0-мл шприц и иглу 16G, отбирали 0,15 мл ОКТЗ. Асептически отделяли иглу от шприца и соединяли шприц с портом для безыгольных инъекций. Вводили инъекцией ОКТЗ. Открывали запорный клапан к пакету для переноса «суспензия питающих клеток» и добавляли 10 мл питающих клеток, удаленных ранее, для смыва ОКТЗ через линию. Переворачивали шприц вверх дном и проталкивали воздух для очистки линии к пакету для переноса суспензии питающих клеток. Оставляли остаточную суспензию питающих клеток в шприце. Закрывали все зажимы и извлекали набор принадлежностей из БББ. Запечатывали термосваркой пакет для переноса суспензии питающих клеток, оставляя достаточную длину трубки для сварки.

День 11 - Заполнение G-Rex и высевание

[001064] Подготовка G-Rex 500MCS. Извлекали G-Rex 500MCS из упаковки и инспектировали флакон в отношении трещин и перегибов трубок. Убеждались, что все крепления Люэра и зажимы закрываются плотно. Закрывали все зажимы на линиях G-Rex 500MCS, кроме линии вентиляционного фильтра. Используя маркер, проводили черту на уровне 4,5 л. Извлекали пакет «полная среда CM2, день 11» из инкубатора.

[001065] Проводили подготовку к закачиванию среды. Соединяли сваркой красную линию G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости с насосом, соединенным с пакетом «полная среда CM2, день 11». Подвешивали мешок «полная среда CM2, день 11» на штатив для внутривенных вливаний. Пропускали трубку насоса через насос Ваха. Закачивали среду в G-Rex 500MCS. Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9». Закачивали 4,5 л среды в G-Rex 500MCS, заполняя до черты на флаконе на уровне 4,5 л. Запечатывали термосваркой красную линию G-Rex 500MCS вблизи сварного шва. Маркировали флакон этикеткой «день 11». Соединяли сваркой пакет для переноса суспензии питающих клеток с флаконом. Стерильно соединяли сваркой красную линию G-Rex 500MCS с пакетом для переноса «суспензия питающих клеток».

[001066] Добавляли питающие клетки в G-Rex 500MCS. Открывали все зажимы между пакетом с суспензией питающих клеток и G-Rex 500MCS, и добавляли суспензию питающих клеток во флакон под действием силы тяжести. Запечатывали термосваркой красную линию вблизи сварного шва. Соединяли сваркой пакет для переноса «суспензия ОИЛ» с флаконом. Стерильно соединяли сваркой красную линию G-Rex 500MCS с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ».

[001067] Добавляли ОИЛ в G-Rex 500MCS. Открывали все зажимы между пакетом «суспензия ОИЛ» и G-Rex 500MCS, и добавляли суспензию ОИЛ во флакон под действием силы тяжести. Запечатывали термосваркой красную линию вблизи сварного шва для удаления мешка с суспензией ОИЛ.

[001068] Инкубировали G-Rex 500MCS. Убеждались, что все зажимы на G-Rex 500MCS закрыты, за исключением большой линии фильтра, и помещали в инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, процентное содержание CO_2 : $5,0 \pm 1,5\% \text{CO}_2$.

[001069] Рассчитывали окно инкубации. Выполняли расчеты для определения надлежащего времени для извлечения G-Rex 500MCS из инкубатора в день 16. Нижний предел: время инкубации+108 часов. Верхний предел: время инкубации+132 часа.

День 11 - Криоконсервирование избытка ОИЛ

[001070] Замораживали флаконы с избыточными ОИЛ. Записывали и проверяли общее количество флаконов, помещенных в морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки (CRF). После завершения замораживания переносили флаконы из CRF в соответствующий контейнер для хранения.

День 16 - Приготовление среды

[001071] Предварительно нагревали среду AIM-V. Извлекали три 10-л мешка со

средой CTS AIM-V из условий 2-8°C по меньшей мере за 12 часов до использования и оставляли при комнатной температуре, защищая от света. Маркировали каждый мешок. Записывали время и дату начала нагревания. Следили за тем, чтобы все мешки нагревались в течение 12-24 часов.

[001072] Соединяли большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с одной из канюль 10-л мешка Labtainer™ с использованием креплений Люэра. Подготавливали 10-л Labtainer™ для супернатанта, маркировали надписью «супернатант». Подготавливали 10-л Labtainer™ для супернатанта. Убеждались, что все зажимы закрыты перед извлечением из БББ.

[001073] Размораживали 5x 1,1-мл аликвот IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) на каждый мешок среды CTS AIM-V до полного таяния льда. Вносили аликвоту 100,0 мл GlutaMax в приемный сосуд соответствующего размера. Записывали объем, добавленный в каждый приемный сосуд, и маркировали каждый приемный сосуд «GlutaMax».

[001074] Добавляли IL-2 к GlutaMax. Используя микропипетку, добавляли 5,0 мл IL-2 в каждый приемный сосуд с GlutaMax. Следили за промыванием наконечника в соответствии с примечанием 5.18 к способу, и использовали новый наконечник пипетки для каждого добавляемого мл. Записывали объем, добавленный в каждый приемный сосуд с GlutaMax, и маркировали каждый приемный сосуд «GlutaMax+IL-2» и номером приемного сосуда.

[001075] Готовили мешок со средой CTS AIM-V для препарата. Убеждались, что 10-л мешок со средой CTS AIM-V (W3012717) нагревался до комнатной температуры и был защищен от света в течение 12-24 часов перед использованием. Записывали время окончания инкубации. В БББ закрывали зажим на 4" наборе для переливания плазмы, затем соединяли с мешком, используя игольные порты. Поддерживали постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Принимали меры, чтобы не проколоть бок порта. Соединяли большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с 4" набором для переливания плазмы через крепление Люэра.

[001076] Помещали насос Ваха рядом с БББ. Извлекали секцию трубки набора для перекачивания жидкости с насосом из БББ и устанавливали в перистальтический насос.

[001077] Проводили подготовку к формулированию среды. В БББ извлекали шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) и выбрасывали. Принимали меры для сохранения стерильности пипетки PLDS. Соединяли пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра, и помещали наконечник пипетки во флакон «GlutaMax+IL-2», подготовленный, как описано ранее, для аспирации. Открывали все зажимы между приемным сосудом и 10-л мешком.

[001078] Закачивали GlutaMax+IL-2 в мешок. Устанавливали скорость насоса на отметку «средняя» и «3», и закачивали «GlutaMax+IL-2» в 10-л мешок со средой CTS AIM-V. Когда раствор заканчивался, очищали линию и останавливали насос. Записывали объем GlutaMax с IL-2, добавленный в каждый из мешков с AIM-V.

[001079] Извлекали PLDS. Убеждались, что все зажимы закрыты, и извлекали пипетку PLDS из набора для перекачивания жидкости с насосом. Извлекали набор для перекачивания жидкости с насосом и закрывали красным колпачком 4” набор для переливания плазмы.

[001080] Маркировали каждый приготовленный мешок «полная среда CM4, день 16».

[001081] Отбирали архивные образцы среды в соответствии с планом сбора образцов. Используя 30-мл шприц, извлекали 20,0 мл «полной среды CM4, день 16», соединяя шприц с 4” набором для переливания плазмы, и помещали образец в 50-мл коническую пробирку. Убеждались, что 4” набор для переливания плазмы либо имел закрытые зажимы, либо был закрыт красным колпачком после удаления шприца.

[001082] Соединяли новый набор для перекачивания жидкости с насосом. Соединяли большего диаметра конец нового набора для перекачивания жидкости с насосом с насосом с 4” набором для переливания плазмы, который был соединен с мешком «полная среда CM4, день 16». Маркировали инвентарной этикеткой в соответствии с планом сбора образцов, и хранили архивный образец среды при температуре 2-8°C до передачи для тестирования.

[001083] Контролируемый инкубатор. Если применимо, проводили мониторинг дополнительных приготовленных мешков. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO₂: 5,0±1,5% CO₂.

[001084] Нагревали полную среду CM4, день 16. Нагревали первый мешок полной среды CM4, день 16, в инкубаторе в течение ≥30 минут до готовности к использованию. Если применимо, нагревали дополнительные мешки.

[001085] Готовили разведения. В БББ добавляли 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована «для разведений при подсчете клеток», в каждую из 4×15-мл конических пробирок. Маркировали конические пробирки. Маркировали 4 криопробирки.

День 16 - Разделение клеток в ПБР

[001086] Контролируемый инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO₂: 5,0±1,5% CO₂.

[001087] Извлекали G-Rex 500MCS из инкубатора. Проводили проверку на соответствие параметров инкубации перед извлечением G-Rex 500MCS из инкубатора: верхний предел, нижний предел, время извлечения. Извлекали G-Rex 500MCS из инкубатора.

[001088] Запечатывали термосваркой 1-л пакет для переноса (W3006645), оставляя ~12” линии. Маркировали 1-л пакет для переноса «суспензия ОИЛ». Помещали 1-л пакет для переноса, включая полную линию, на весы и записывали сухую массу.

[001089] Проводили подготовку GatheRex. Стерильно соединяли сваркой красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости с насосом на 10-л мешке Labtainer™ «супернатант», подготовленном, как описано выше. Стерильно соединяли сваркой прозрачную линию для удаления клеток из G-Rex 500MCS

с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ», подготовленным, как описано выше. Помещали флакон G-Rex 500MCS слева от GatheRex. Помещали мешок Labtainer™ «супернатант» и пакет для переноса «суспензия ОИЛ» справа. Устанавливали красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливали прозрачную линию для сбора клеток из G-Rex 500MCS в нижний зажим (маркированный линией линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Соединяли газовую линию GatheRex со стерильным фильтром G-REX 500MCS. ПРИМЕЧАНИЕ: перед удалением супернатанта из G-Rex 500MCS, убеждались, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

[001090] Уменьшение объема в G-Rex 500MCS. Переносили ~4,5 л культурального супернатанта из G-Rex 500MCS в 10-л Labtainer™ в соответствии с СОП-01777. Визуально инспектировали флакон G-REX 500MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации.

[001091] Готовили флакон для сбора ОИЛ. После удаления супернатанта закрывали все зажимы на красной линии.

[001092] Начинали сбор ОИЛ. Записывали время начала сбора ОИЛ. Энергично постукивали по флакону и вращали для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. Инспектировали флакон, чтобы убедиться, что все клетки открепились. Наклоняли флакон, чтобы убедиться, что заборная трубка находится на краю флакона. Если трубка для сбора клеток находится не на стыке стенки и нижней мембраны, постукивания по флакону, с наклоном его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

[001093] Сбор ОИЛ. Открывали все зажимы, ведущие к пакету для переноса суспензии ОИЛ. Используя GatheRex, переносили клеточную суспензию в пакет для переноса суспензии ОИЛ. ПРИМЕЧАНИЕ: следует следить за поддержанием наклонного положения до полного сбора всех клеток и среды. Проверяли мембрану на прикрепленные клетки.

[001094] Промывали мембрану флакона. Промывали дно G-Rex 500MCS. Покрывали ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой. Закрывали зажимы на G-Rex 500MCS. Убеждались, что все зажимы закрыты на G-Rex 500MCS.

[001095] Запечатывали термосваркой. Запечатывали термосваркой пакет для переноса, содержащий ОИЛ, как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения. Запечатывали термосваркой 10-л Labtainer™, содержащий супернатант, и переносили в БББ для сбора образцов.

[001096] Записывали массу пакета для переноса с клеточной суспензией и рассчитывали объем суспензии. Подготавливали пакет для переноса для отбора образца. Соединяли сваркой 4” набор для переливания плазмы с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ», описанным выше, сохраняя канюлю Люэра как можно ближе к мешку.

[001097] Отбирали образцы для тестирования из клеточного супернатанта. В БББ отбирали 10,0 мл супернатанта из 10-л Labtainer™, используя канюлю Люэра и шприц

соответствующего размера. Помещали в 15-мл коническую пробирку, маркировали надписью «Вас-Т» и сохраняли пробирку с образцом для Вас-Т. Используя отдельный шприц, отбирали 10,0 мл супернатанта и помещали в 15-мл коническую пробирку. Сохраняли пробирку с образцом для анализа микоплазмы. Маркировали пробирку «разбавитель для анализа микоплазмы». Закрывали мешок с супернатантом. Закрывали красным колпачком канюлю Люэра, закрывая мешок, и выносили из БББ.

[001098] Отбирали образцы для подсчета клеток. В БББ, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, отбирали 4х 1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса «суспензия ОИЛ» с использованием крепления Люэра. Помещали образцы в криопробирки, подготовленные, как описано выше.

[001099] Отбирали образцы для анализа микоплазмы. Используя 3-мл шприц, отбирали 1,0 мл из пакета для переноса «суспензия ОИЛ» и помещали в 15-мл коническую пробирку, маркированную «разбавитель для анализа микоплазмы», подготовленную, как описано выше. Маркировали и хранили образец для анализа микоплазмы при температуре 2-8°C до передачи для тестирования.

[001100] Готовили пакет для переноса для высевания клеток. В БББ соединяли большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с адаптером Люэра на пакете для переноса, содержащем ОИЛ. Зажимали линию близко к пакету для переноса, используя кровоостанавливающий зажим. Надевали красный колпачок на конец набора для перекачивания жидкости с насосом.

[001101] Помещали ОИЛ в инкубатор. Извлекали клеточную суспензию из БББ и помещали в инкубатор до использования. Записывали время.

[001102] Выполняли подсчет клеток. Выполняли подсчет клеток и расчеты, используя NC-200. Сначала разбавляли образцы для подсчета клеток путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленной, как описано выше. Это приводило к разведению 1:10.

[001103] Рассчитывали количество флаконов для культивирования. Рассчитывали общее количество флаконов для высевания клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: округляли количество флаконов G-Rex 500MCS для засеваания в большую сторону до ближайшего целого числа.

ТАБЛИЦА 35: расчет количества флаконов

Общее количество жизнеспособных клеток	Целевое количество клеток в расчете на флакон	Количество флаконов G-Rex 500MCS для засеваания
A	B	C= A÷B
клетки	1,0×10⁹ клеток/флакон	флаконы

[001104] Максимальное количество флаконов G-Rex 500MCS для засеваания составляло пять. Если расчетное количество флаконов для засеваания превышало пять, только пять флаконов заседали, **ИСПОЛЬЗУЯ ВСЕ ДОСТУПНЫЙ ОБЪЕМ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ.**

[001105] Определяли необходимое количество дополнительных мешков со средой. Рассчитывали количество мешков со средой, необходимое помимо мешка, приготовленного ранее. Округляли необходимое количество мешков со средой в большую сторону до ближайшего целого числа.

ТАБЛИЦА 36: Расчет количества мешков со средой

Количество флаконов G-Rex 500MCS для засеваания А	Необходимое количество мешков со средой $B=A \div 2^*$	Количество мешков, приготовленных ранее С	Количество дополнительных мешков для подготовки $D=B-C$
		1	

[001106] Готовили дополнительную среду по мере необходимости. Готовили один 10-л мешок «среды СМ4, день 16» для каждых двух необходимых флаконов G-Rex-500M в соответствии с расчетами, приведенными выше. Продолжали процесс и засекали первый флакон(ы) GREX-500M, пока дополнительную среду готовили и нагревали.

[001107] Готовили дополнительные мешки со средой по мере необходимости. Готовили и нагревали рассчитанное количество дополнительных мешков со средой, определенное, как описано выше.

[001108] Заполняли G-Rex 500MCS. Открывали G-Rex 500MCS на столешнице и инспектировали флакон в отношении трещин и перегибов трубок. Убеждались, что все крепления Люэра и зажимы закрываются плотно. Делали отметку на уровне 4500 мл с внешней стороны флакона маркером. Закрывали все зажимы на G-Rex 500MCS, кроме большой линии фильтра. Стерильно соединяли сваркой красную линию для среды G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости на мешке со средой, приготовленном ранее.

[001109] Проводили подготовку к прокачке среды. Подвешивали пакет «среда СМ4, день 16» на штатив для внутривенных вливаний. Пропускали трубку насоса через насос Ваха.

[001110] Закачивали среду в G-Rex 500MCS. Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9», и закачивали 4500 мл среды во флакон. Закачивали 4,5 л «среды СМ4, день 16» в G-Rex 500MCS, заполняя до линии, отмеченной на флаконе ранее. После переноса 4,5 л среды останавливали насос.

[001111] Запечатывали термосваркой. Запечатывали термосваркой красную линию G-Rex 500MCS вблизи созданного сварного шва, удаляя мешок со средой.

[001112] Повторяли заполнение. Повторяли этапы заполнения и запечатывания сваркой для каждого флакона, рассчитанного, как описано выше, когда среда нагревалась и была готова для использования. Можно заполнять несколько флаконов одновременно, используя заполнение под действием силы тяжести или несколько насосов. Заполняют только два флакона на каждый мешок со средой.

[001113] Записывали и маркировали заполненный флакон(ы). Маркировали

каждый флакон в алфавитном порядке, а также этикеткой «день 16».

[001114] Инкубировали флакон по мере необходимости. Держали флакон в инкубаторе в ожидании засева ОИЛ. Записывали общее количество заполненных флаконов.

[001115] Рассчитывали объем клеточной суспензии для добавления. Рассчитывали целевой объем суспензии ОИЛ для добавления в новые флаконы G-Rex 500MCS.

ТАБЛИЦА 37: Объем клеточной суспензии

Общий объем суспензии ОИЛ А	Количество заполняемых флаконов	Целевой объем клеточной суспензии для переноса в каждый флакон $C = A \div B$
мл		мл

[001116] Если количество флаконов превышает пять, только пять будут засеяны, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВСЕГО ОБЪЕМА КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ.

[001117] Готовили флаконы для засева. Извлекали флаконы G-Rex 500MCS из этапа 8.10.70 из инкубатора.

[001118] Проводили подготовку для закачивания. Закрывали все зажимы на G-Rex 500MCS, кроме большой линии фильтра. Пропускали трубку насоса через насос Ваха.

[001119] Извлекали ОИЛ из инкубатора. Извлекали пакет для переноса «суспензия ОИЛ» из инкубатора, и записывали время окончания инкубации.

[001120] Готовили клеточную суспензию для высевания. Стерильно соединяли сваркой пакет для переноса «суспензия ОИЛ», описанный выше, для прокачки входной линии.

[001121] Помещали мешок с суспензией ОИЛ на весы. Примировали линию от мешка с суспензией ОИЛ до сварного шва, используя насос Ваха, со скоростью, установленной на отметку «низкая» и «2». Тарировали весы.

[001122] Засевали флакон суспензией ОИЛ. Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «средняя» и «5». Закачивали объем суспензии ОИЛ, рассчитанный ранее, во флакон. Записывали объем суспензии ОИЛ, добавленной в каждый флакон.

[001123] Запечатывали термосваркой. Запечатывали термосваркой пакет для переноса «суспензия ОИЛ», оставляя достаточной длины трубку до сварного шва, на следующем флаконе.

[001124] Заполняли оставшиеся флаконы. Между всеми засеваемыми флаконами обязательно перемешивали пакет для переноса «суспензия ОИЛ», и повторяли этапы заполнения и запечатывания сваркой для засева всех оставшихся флаконов.

[001125] Контролируемый инкубатор. Если флаконы должны быть разделены между двумя инкубаторами, обязательно нужно контролировать оба. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, процентное содержание CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ CO_2 . Записывали время помещения каждого флакона в инкубатор.

[001126] Рассчитывали окно инкубации. Производили описанные ниже расчеты

для определения временного диапазона для извлечения G-Rex 500MCS из инкубатора в день 22. Нижний предел: время +132 часа; верхний предел: время+156 часов.

День 22 - Приготовление промывающего буфера

[001127] Готовили 10-л мешок Labtainer™. В БББ соединяли 4” набор для переливания плазмы с 10-л мешком Labtainer™ через крепление Люэра. Приготовленный 10-л мешок Labtainer™ маркировали надписью «супернатант», номером лота и инициалом/датой. Закрывали все зажимы перед вынесением из БББ. ПРИМЕЧАНИЕ: готовили один 10-л мешок Labtainer™ для каждых двух флаконов G-Rex 500MCS, из которых будут собраны клетки.

[001128] Соединяли сваркой набор для перекачивания жидкости. Вне БББ закрывали все зажимы на 4S-4M60. Соединяли сваркой набор для перекачивания жидкости с одним из конусов Люэра в 4S-4M60.

[001129] Переносили Plasmalyte-A и человеческий альбумин с концентрацией 25% в БББ. Переносили 4S-4M60 и конструкцию набора для перекачивания жидкости с насосом в БББ.

ТАБЛИЦА 38: Компоненты

Описание компонента	Необходимое количество
Plasmalyte-A	3000,0 мл
Человеческий альбумин, 25%	120,0 мл
4S-4M60 с набором для перекачивания жидкости с насосом	1 аппарат из этапа 8.11.7

ТАБЛИЦА 39: Plasmalyte-A

Латекс:	Сделано не с латексом из натурального каучука
Тип контейнера:	VIAFLEX
ПВХ:	Содержит ПВХ
ДЭГФ:	Содержит ДЭГФ
Объем:	500 мл
Общее количество калорий:	21 Ккал/л
Натрий:	140 мЭкв/л
Калий:	5 мЭкв/л
Магний:	3 мЭкв/л
Ацетат:	27 мЭкв/л
Хлорид:	98 мЭкв/л
Глюконат:	23 мЭкв/л
Осмолярность (мОсмол/л):	294
Удельный вес:	1,01

рН:	7,4
Диапазон объема заполнения (мл):	530-565
Срок годности после изготовления:	15 месяцев
Содержит консервант:	Нет
Рекомендации по хранению:	Хранить при комнатной температуре (25°C/77°F); краткосрочное воздействие 40°C/104°F не влияет негативно на продукт.
Упаковка:	Одна упаковка
Только по рецепту:	Да

**Коммерчески доступно по адресу <http://ecatalog.baxter.com/ecatalog/loadproduct.html?cid=20016&lid=10001&hid=20001&pid=821874>.

[001130] Закачивали Plasmalyte в 3000-мл мешок. Соединяли иглами три мешка Plasmalyte-A с набором коннекторов 4S-4M60. ПРИМЕЧАНИЕ: необходимо протирать колпачок порта спиртовым тампоном (W3009488) перед снятием. ПРИМЕЧАНИЕ: необходимо поддерживать постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Необходимо принимать меры, чтобы не проколоть бок порта. Соединяли 3000-мл собирающий мешок Origen через крепление Люэра с большего диаметра концом трубки набора для перекачивания жидкости с насосом. Закрывали зажимы на неиспользуемых линиях 3000-мл мешка Origen. Помещали насос Ваха рядом с БББ. Пропускали трубку набора для перекачивания жидкости через насос Ваха, расположенный вне БББ. Устанавливали скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9». Открывали все зажимы от Plasmalyte-A к 3000-мл мешку Origen. Закачивали весь объем Plasmalyte-A в 3000-мл мешок Origen. После переноса всего Plasmalyte-A останавливали насос. При необходимости, удаляли воздух из 3000-мл мешка Origen, меняя направление в насосе на противоположное и меняя положение мешка. Закрывали все зажимы.

[001131] Отделяли 3000-мл мешок от набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра, и закрывали красным колпачком (W3012845) линию на мешке.

[001132] Добавляли человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Открывали вентилируемую мини-иглу. Не нарушая стерильность иглы, убеждались, что синий колпачок надежно закреплен. Прокалывали перегородку флакона с 25% человеческим альбумином вентилируемой мини-иглой. ПРИМЕЧАНИЕ: необходимо принимать меры для соблюдения стерильности иглы. Повторяли два раза для, в общей сложности, трех (3) проколотых флаконов с 25% человеческим альбумином. Удаляли синий колпачок с одной вентилируемой мини-иглы, и присоединяли 60-мл шприц к флакону с 25% человеческим альбумином. Отбирали до 60 мл 25% человеческого альбумина. Может быть необходимо использовать более одного флакона 25%

человеческого альбумина. При необходимости, отсоединяли шприц от вентилируемой мини-иглы и соединяли его со следующей вентилируемой мини-иглой во флаконе с 25% человеческим альбумином. После получения 60 мл удаляли шприц с вентилируемой мини-иглы. Соединяли шприц с портом для безыгольных инъекций на 3000-мл мешке Origen, заполненном Plasmalyte-A. Выпускали весь 25% человеческий альбумин. Повторяли до достижения конечного объема 120,0 мл 25% человеческого альбумина. Осторожно перемешивали содержимое мешка после добавления всего 25% человеческого альбумина. Маркировали надписью «промывающий буфер LOVO» и указывали срок годности 24 часа.

[001133] Готовили разбавитель П-2. При помощи 10-мл шприца отбирали 5,0 мл промывающего буфера LOVO, используя порт для безыгольных инъекций на мешке с промывающим буфером LOVO. Помещали промывающий буфер LOVO в 50-мл коническую пробирку и маркировали надписью «разбавитель П-2».

[001134] Отбирали аликвоту промывающего буфера LOVO для пустого мешка в CRF. Используя 100-мл шприц, отбирали до 70,0 мл промывающего буфера LOVO из порта для безыгольных инъекций. ПРИМЕЧАНИЕ: протирали порт для безыгольных инъекций спиртовым тампоном перед каждым использованием. Надевали красный колпачок на шприц и маркировали надписью «пустой криомешок» и номером лота. ПРИМЕЧАНИЕ: хранили шприц при комнатной температуре до использования на этапе 8.14.3.

[001135] Завершали приготовление промывающего буфера. Закрывали все зажимы на мешке с промывающим буфером LOVO.

[001136] Размораживали П-2. Размораживали один 1,1-мл флакон П-2 (6×10^6 МЕ/мл) до полного таяния льда. Записывали номер лота П-2 и срок годности. ПРИМЕЧАНИЕ: убеждались, что прикреплена этикетка П-2.

[001137] Приготовление П-2. Добавляли 50 мкл маточного раствора П-2 (6×10^6 МЕ/мл) в 50-мл коническую пробирку, маркированную «разбавитель П-2».

[001138] Приготовление П-2. Заново маркировали коническую пробирку надписью «П-2 6×10^4 », датой, номером лота и сроком годности 24 часа. Закрывали крышкой и хранили при 2°C-8°C.

[001139] Подготовка криоконсервирования. Помещали 5 криокассет в условия 2°C-8°C с целью их подготовки для криоконсервирования конечного препарата.

[001140] Готовили разведения для подсчета клеток. В БББ добавляли 4,5 мл среды АИМ-V, которая была маркирована номером лота и надписью и «для разведений при подсчете клеток», в 4 отдельные 15-мл конические пробирки, и маркировали пробирки.

[001141] Проводили подготовку для подсчета клеток. Маркировали 4 криофлакона номерами флаконов (1-4).

День 22 - Сбор ОИЛ

[001142] Контролировали инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: $37 \pm 2,0^\circ\text{C}$, процентное содержание CO_2 : $5\% \pm 1,5\%$.

[001143] Извлекали флаконы G-Rex 500MCS из инкубатора. Проверяли флаконы и подтверждали соответствие параметров инкубации перед извлечением G-Rex 500MCS из инкубатора (время инкубации).

[001144] Готовили собирающий мешок для ОИЛ. Маркировали 3000-мл собирающий мешок надписью «суспензия ОИЛ», номером лота и инициалом/датой.

[001145] Запечатывали сваркой лишние крепления. Запечатывали термосваркой два крепления Люэра на собирающем мешке вблизи конца каждого крепления.

[001146] Подготовка GatheRex. Стерильно соединяли сваркой (в соответствии с примечанием 5.11 к способу) красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS с 10-л мешком Labtainer™, приготовленным, как описано выше. ПРИМЕЧАНИЕ: сверялись с примечанием 5.16 к способу для использования нескольких устройств GatheRex. Стерильно соединяли сваркой ((в соответствии с примечанием 5.11 к способу) прозрачную линию для удаления клеток из G-Rex 500MCS с собирающим мешком для суспензии ОИЛ, подготовленным, как описано выше. Помещали флакон G-Rex 500MCS слева от GatheRex. Помещали мешок Labtainer™ для супернатанта и собирающий мешок для объединенной суспензии ОИЛ справа. Устанавливали красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливали прозрачную линию для сбора клеток из G-Rex 500MCS в нижний зажим (маркированный линией линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Соединяли газовую линию GatheRex со стерильным фильтром G-REX 500MCS. Перед удалением супернатанта из G-Rex 500MCS, убеждались, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

[001147] Уменьшение объема. Переносили ~4,5 л супернатанта из G-Rex 500MCS в мешок для супернатанта. Визуально инспектировали флакон G-REX 500MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации. При необходимости повторяли этап.

[001148] Готовили флакон для сбора ОИЛ. После удаления супернатанта закрывали все зажимы на красной линии.

[001149] Начинали сбор ОИЛ. Записывали время начала сбора ОИЛ. Энергично постукивали по флакону и вращали для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. Инспектировали флакон, чтобы убедиться, что все клетки открепилась. Помещали 3000-мл собирающий мешок «суспензия ОИЛ» на сухие салфетки на плоской поверхности. Наклоняли флакон, чтобы убедиться, что заборная трубка находится на краю флакона. ПРИМЕЧАНИЕ: если трубка для сбора клеток находится не на стыке стенки и нижней мембраны, постукивания по флакону, с наклоном его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

[001150] Сбор ОИЛ. Открывали все зажимы, ведущие к собирающему мешку для суспензии ОИЛ. Используя GatheRex, переносили суспензию ОИЛ в 3000-мл собирающий мешок. ПРИМЕЧАНИЕ: поддерживали наклонное положение до полного сбора всех

клеток и среды. Проверляли мембрану на прикрепленные клетки.

[001151] Промывали мембрану флакона. Промывали дно G-Rex 500MCS. Покрывали ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой.

[001152] Закрывали зажимы на G-Rex 500MCS. Убеждались, что все зажимы закрыты.

[001153] Запечатывали термосваркой. Запечатывали термосваркой собирающий мешок, содержащий ОИЛ, как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения. Запечатывали термосваркой мешок с супернатантом.

[001154] Завершали сбор клеток из оставшихся флаконов G-Rex 500MCS. Повторяли описанные выше этапы, объединяя все ОИЛ в один и тот же собирающий мешок. Было необходимо заменять 10-л мешок для супернатанта после каждого 2-го флакона.

[001155] Готовили исходный мешок LOVO. Получали новый 3000-мл собирающий мешок. Маркировали надписью «исходный мешок LOVO», номером лота и инициалом/датой. Запечатывали термосваркой трубку на «исходном мешке LOVO», удаляя канюли Люэра, оставляя линию достаточной длины до сварного шва.

[001156] Взвешивали исходный мешок LOVO. Помещали пластиковый контейнер соответствующего размера на весы и тарировали. Помещали исходный мешок LOVO, включая порты и линии, в контейнер и записывали сухую массу.

[001157] Переносили клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Закрывали все зажимы 170-мкм гравитационного фильтра для крови.

[001158] Переносили клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Стерильно соединяли сваркой длинный конец гравитационного фильтра для крови с исходным мешком LOVO. Стерильно соединяли сваркой одну из двух исходных линий фильтра с собирающим мешком «объединенная суспензия ОИЛ». После завершения сварки запечатывали термосваркой неиспользуемую линию на фильтре для ее удаления. Открывали все необходимые зажимы и приподнимали суспензию ОИЛ, подвешивая собирающий мешок на штатив для внутривенных вливаний, чтобы начать пропускание под действием силы тяжести ОИЛ через фильтр для крови и в исходный мешок LOVO. Осторожно вращали или разминали мешок с суспензией ОИЛ в процессе его опорожнения для поддержания ОИЛ в однородной суспензии.

[001159] Закрывали все зажимы. После переноса ОИЛ в исходный мешок LOVO закрывали все зажимы.

[001160] Запечатывали термосваркой. Запечатывали термосваркой (в соответствии с примечанием 5.12 к способу) как можно ближе к сварному шву для удаления гравитационного фильтра для крови.

[001161] Отбирали образцы для подсчета клеток. В БББ, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, отбирали 4x 1,0-мл образца для подсчета клеток из исходного мешка LOVO с использованием порта для безыгольных инъекций. Помещали

образцы в криопробирки, подготовленные на этапе 8.11.36.

[001162] Выполняли подсчет клеток. Выполняли подсчет клеток и расчеты с использованием NC-200. Сначала разбавляли образцы для подсчета клеток путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленной, как описано выше. Это приводило к разведению 1:10.

[001163] Записывали количества клеток и объемы образцов. Рассчитывали общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ. Если общее количество жизнеспособных клеток $\geq 1,5 \times 10^9$, продолжали процесс. Рассчитывали общее количество ядросодержащих клеток.

[001164] Готовили разбавитель для анализа микоплазмы. В БББ отбирали 10,0 мл из одного мешка с супернатантом через порт Люэра для отбора образцов и помещали в 15-мл коническую пробирку. Маркировали 15-мл коническую пробирку «разбавитель для анализа микоплазмы».

LOVO

[001165] Включали LOVO и начинали протокол «Сбор ОИЛ G-Rex», следовали инструкциям на дисплее. Буфером был PlasmaLyte. Следовали инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

[001166] Определяли целевой объем конечного препарата. Используя значение общего количества ядросодержащих клеток (ОКЯК) и приведенную ниже схему, определяли целевой объем конечного препарата, и записывали(мл).

ТАБЛИЦА 40: Расчет объема конечного препарата

Диапазон клеток	Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)
0 < общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 7,1 \times 10^{10}$	165
$7,1 \times 10^{10}$ < общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1,1 \times 10^{11}$	215
$1,1 \times 10^{11}$ < общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1,5 \times 10^{11}$	265

[001167] Следовали инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

[001168] Загружали одноразовый набор. Перед загрузкой одноразового набора протирали порт датчика давления спиртовой салфеткой, а затем не оставляющей ворс салфеткой. Загружали одноразовый набор. Следовали инструкциям на дисплее по загрузке одноразового набора.

[001169] Извлекали мешок с фильтратом. После загрузки стандартного одноразового набора LOVO нажимали кнопку «далее». На дисплее появлялась надпись «информация о контейнере и расположении». Удаляли мешок с фильтратом с весов.

[001170] Убеждались, что контейнер фильтрата являлся «новым» и «не на весах».

[001171] Вносили информацию о емкости фильтрата. Стерильно соединяли сваркой вспомогательный мешок LOVO и линию с конусом Люэра имеющегося мешка с

фильтратом. Убеждались, что все зажимы открыты и путь для жидкости свободен. Нажимали на поле ввода емкости контейнера фильтрата. На дисплее появлялась цифровая клавиатура. Вносили общую емкость нового фильтрата (5000 мл). Нажимали кнопку «выполнено» для ввода данных. ПРИМЕЧАНИЕ: расчетный объем фильтрата не должен превышать 5000 мл.

[001172] Помещали контейнер фильтрата на столешницу. ПРИМЕЧАНИЕ: если трубка была удалена из зажима F во время сварки, вновь помещали трубку в зажим. Помещали новый контейнер фильтрата на столешницу. НЕ подвешивали мешок с фильтратом на весах № 3. Весы № 3 остаются пустыми во время процедуры.

[001173] Следовали инструкциям на сенсорном дисплее LOVO после изменений для контейнера фильтрата.

[001174] Убеждались, что набор был загружен надлежащим образом. На дисплее появлялся трафарет проверки в сухом состоянии одноразового набора. Проверяли, чтобы набор был загружен правильно и все зажимы были открыты. Проверяли все трубки на перекручивание или другие препятствия, и исправляли при необходимости. Убеждались, что набор был установлен правильно, проверяли все зажимы Роберта. Нажимали кнопку «да». Все механические зажимы LOVO закрывались автоматически, и на дисплее появлялась надпись «проверка установки одноразового набора». LOVO проводил серию этапов герметизации для проверки набора.

[001175] Результаты проверки набора. Если проверка набора проходила удачно, переходили к следующему этапу. *В случае неудачи, после завершения проверки может быть произведена вторая проверка набора. *В случае неудачи, проверяли все трубки на перекручивание или другие препятствия, и исправляли их. *В случае неудачи, убеждались, что набор был установлен правильно, проверяли все зажимы Роберта. В случае неудачной 2-й проверки набора: следует сообщать территориальному менеджменту и готовить к установке новый набор в соответствии с разделом 10.0. Необходимо повторение этапов 8.13.23-8.13.30.

[001176] Соединяли PlasmaLyte. На дисплее появлялась надпись «соединительные растворы». Промывающий объем всегда составлял 3000 мл. Указывали это значение на экране.

[001177] Стерильно соединяли сваркой 3000-мл мешок PlasmaLyte с трубкой, проходящей через зажим 1. Подвешивали мешок с PlasmaLyte на штатив для внутривенных вливаний, помещая обе угловые петли мешка на крючок.

[001178] Убеждались, что PlasmaLyte присоединен. Открывали все пластиковые зажимы. Убеждались, что объем входящего раствора составлял 3000 мл. Нажимали кнопку «далее». На дисплее появлялся трафарет заправки одноразового набора. Убеждались, что PlasmaLyte присоединен, и все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к PlasmaLyte, открыты, затем нажимали кнопку «да».

[001179] Наблюдали движение PlasmaLyte. Начиналась заправка одноразового набора, и на дисплее появлялась надпись «заправка одноразового набора». Визуально

наблюдали, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком с PlasmaLyte. Если жидкость не двигалась, нажимали кнопку «пауза» на экране и проверяли, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы нажимали кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки одноразового набора. Следовали инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

[001180] Соединяли исходный контейнер с трубкой. Стерильно соединяли сваркой исходный мешок LOVO, подготовленный на этапе 8.12.31 с трубкой, проходящей через зажим S в соответствии с примечанием 5.11 к способу. Может быть необходимо удалять трубку из зажима. ПРИМЕЧАНИЕ: принимали меры для повторного помещения трубки исходного контейнера в зажим S, в случае ее удаления.

[001181] Подвешивали исходный контейнер. Подвешивали исходный контейнер на штатив для внутривенных вливаний, помещая обе угловые петли мешка на крючок. НЕ подвешивали исходный контейнер на весы № 1. Открывали все зажимы на исходном мешке.

[001182] Убеждались, что исходный контейнер присоединен. Нажимали кнопку «далее». На дисплее появлялся трафарет заправки исходного контейнера. Убеждались, что исходный контейнер соединен с одноразовым набором, и что все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к исходному контейнеру, открыты. Нажимали кнопку «да».

[001183] Убеждались, что PlasmaLyte двигался. Начинаясь заправка исходного контейнера, и на дисплее появлялась надпись «заправка исходного контейнера». Визуально наблюдали, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком исходного контейнера. Если жидкость не двигалась, нажимали кнопку «пауза» на экране и проверяли, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы нажимали кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки исходного контейнера.

[001184] Надпись на дисплее «начало процедуры». После успешного завершения заправки исходного контейнера на дисплее появлялась надпись «начало процедуры». Нажимали кнопку «старт», сразу после нажатия кнопки «старт» появлялся экран для паузы «предварительная промывка, цикл 1».

[001185] Переворачивали используемый мешок. Снимали используемый мешок с весов № 2 (также можно удалять трубку из направляющей детали для трубки верхнего порта используемого мешка) и вручную переворачивали его, чтобы позволить промывающему буферу, добавленному на этапе заправки одноразового набора, покрыть все внутренние поверхности мешка. Вновь вешали используемый мешок на весы № 2 (этикетка на мешке направлена влево). Повторно устанавливали трубку верхнего порта в направляющую деталь для трубки, если она была удалена.

[001186] Переворачивали исходный мешок. Прежде, чем нажать кнопку «старт», перемешивали содержимое исходного мешка, не снимая его со штатива для внутривенных вливаний, путем разминания углов мешка и осторожного вращения для создания

однородной клеточной суспензии. Нажимали кнопку «возобновить». LOVO начинал прокачивать жидкость из исходного мешка, и на дисплее появлялась надпись «промывание, цикл 1».

[001187] Пауза для промывания исходного мешка. После того, как исходный контейнер был опустошен, и LOVO добавил промывающий буфер в исходный мешок, появлялся экран для паузы «промывание исходного контейнера». Не снимая исходный мешок со штатива для внутривенных вливаний, разминали углы мешка и тщательно перемешивали содержимое. Нажимали кнопку «возобновить».

[001188] Пауза для перемешивания используемого мешка. Для подготовки клеток к очередному проходу через вращающее устройство в используемый мешок был добавлен промывающий буфер. После добавления промывающего буфера в используемый мешок LOVO автоматически делал паузу и появлялся экран для паузы «перемешивание используемого мешка». Не снимая мешок с весов, тщательно перемешивали содержимое, осторожно сжимая мешок. Нажимали кнопку «возобновить».

[001189] Пауза для разминания углов используемого мешка. После опустошения используемого мешка промывающий буфер был добавлен через нижний порт используемого мешка для промывания мешка. После добавления промывающей жидкости LOVO автоматически делал паузу, и появлялся экран для паузы «разминание углов ИМ». При появлении экрана для паузы «разминание углов ИМ» НЕ снимали мешок с весов № 2. С используемым мешком, все еще висящим на весах № 2, разминали углы мешка для перевода всех остаточных клеток в суспензию. Убеждались, что мешок не качался на весах и нажимали кнопку «возобновить».

[001190] Ожидали появления надписи «удаление препаратов». После завершения процедуры LOVO на дисплее появлялась надпись «удаление препаратов». Когда появляется эта надпись, можно производить манипуляции со всеми мешками в наборе LOVO. ПРИМЕЧАНИЕ: нельзя прикасаться к каким-либо мешкам до появления на дисплее надписи «удаление препаратов».

[001191] Удаляли мешок ретентата. Помещали кровоостанавливающий зажим на трубку очень близко к порту на мешке ретентата, чтобы уберечь клеточную суспензию от оседания в трубке. Запечатывали термосваркой (в соответствии с примечанием 5.12 к способу) ниже кровоостанавливающего зажима, убеждаясь, что оставалась линия достаточной длины до сварного шва на этапе 8.13.48. Удаляли мешок ретентата.

[001192] Готовили мешок ретентата для формулирования. Соединяли сваркой канюлю Люэра 4" набора для переливания плазмы с мешком ретентата. Переносили мешок ретентата.

[001193] Удаляли препараты. Следовали инструкциям на дисплее по удалению препаратов. Закрывали все зажимы на наборе LOVO для предотвращения движения жидкости.

[001194] Удаляли препараты. Нажимали кнопку «далее». Открывались все механические зажимы LOVO и на дисплее появлялась надпись «удаление набора».

[001195] Записывали данные. Следовали инструкциям на дисплее по удалению набора. Нажимали кнопку «далее». Закрывались все механические зажимы LOVO, и на дисплее появлялась надпись «сводные результаты». Записывали данные с экрана «сводные результаты». Закрывали все насосы и фильтровальные устройства. Удаляли набор, когда соответствующие инструкции поступали от LOVO. Все записанные периоды времени были записаны непосредственно с дисплея LOVO.

Окончательное формулирование и фасовка

[001196] Расчет целевого объема/мешок. На основании таблицы 41, приведенной ниже, выбирали количество мешков CS750 для заполнения, целевой объем заполнения на мешок, удаляемый объем для архивного препарата на мешок и конечный целевой объем на мешок, которые соответствуют объему ретентата LOVO, полученного, как описано выше.

ТАБЛИЦА 41: Расчет целевого объема/мешок

Объем препарата LOVO	Объем CS10 для добавления к препарату	Конечный прогнозируемый объем сформулированного препарата	Количество мешков для заполнения	Целевой объем заполнения на мешок	Удаляемый объем для архивного образца на мешок	Конечный целевой объем на мешок
165 мл	165 мл	330 мл	3	107 мл	7 мл	100 мл
215 мл	215 мл	430 мл	4	105 мл	5 мл	100 мл
265 мл	265 мл	530 мл	4	130 мл	5 мл	125 мл

[001197] Готовили пустую пробу для CRF. Рассчитывали объем CS-10 и промывающего буфера LOVO для формулирования мешка пустой пробы.

ТАБЛИЦА 42: Рассчитанные объемы

Конечный целевой объем на мешок	Объем промывающего буфера LOVO для пустой пробы	Объем CS-10 для пустой пробы (мл)
A	$V=A/2$	$C=B$
мл	мл	мл

[001198] Готовили пустую пробу для CRF. Вне БББ, используя шприц с промывающим буфером LOVO, приготовленным, как описано выше, добавляли рассчитанный объем в пустой мешок CS750 через крепление Люэра. ПРИМЕЧАНИЕ: препарат в мешке с пустой пробой CS750 не обязательно должен быть получен асептически. Используя шприц соответствующего размера, добавляли объем CS-10, рассчитанный для того же мешка CS750, подготовленного ранее. Надевали красный колпачок на мешок CS750. Удаляли как можно больше воздуха из мешка CS-750. Запечатывали термосваркой мешок CS750 как можно ближе к мешку, удаляя трубку.

Маркировали мешок CS750 надписью «пустая проба для CRF», номером лота и инициалом/датой. Помещали пустую пробу CRF на охлаждающие пакеты до переноса ее в CRF.

[001199] Рассчитывали необходимый объем ПЛ-2. Рассчитывали объем ПЛ-2 для добавления к конечному препарату.

ТАБЛИЦА 43: Рассчитанный объем ПЛ-2

Параметр	Формула	Результат
Конечный объем ретентата	Этап 8,13,51	A. мл
Конечный объем сформулированного препарата	$B=A \times 2$	B. мл
Нужная конечная концентрация ПЛ-2 (МЕ/мл)	300 МЕ/мл	C. 300 МЕ/мл
Необходимое количество МЕ ПЛ-2	$D=B \times C$	D. МЕ
Рабочий маточный раствор ПЛ-2 из этапа 8.11.33	6×10^4 МЕ/мл	E. 6×10^4 МЕ/мл
Объем ПЛ-2 для добавления к конечному препарату	$F=D \div E$	F. мл

[001200] Собирали соединительное устройство. Стерильно соединяли сваркой 4S-4M60 с CC2 Cell Connect, заменяя одну иглу устройства Cell Connect 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60.

[001201] Собирали соединительное устройство. Стерильно соединяли сваркой криомешки CS750 с набором принадлежностей, подготовленным ранее, заменяя один из четырех конусов Люэра (E) на каждый мешок. Соединяли сваркой (в соответствии с примечанием 5.11 к способу) мешки CS-10 с иглами 4S-4M60. Продолжали охлаждать CS-10 за счет помещения мешков между двумя охлаждающими пакетами, имеющими температуру 2-8°C.

[001202] Готовили ОИЛ с ПЛ-2. Используя шприц соответствующего размера, отбирали количество ПЛ-2, определенное, как описано выше, из аликвоты «ПЛ-2 6×10^4 ». Соединяли шприц с мешком ретентата, подготовленным, как описано выше, через крепление Люэра, и инъецировали ПЛ-2. Очищали линию путем проталкивания воздуха из шприца через линию.

[001203] Маркировали мешок со сформулированными ОИЛ. Закрывали зажим на наборе для перекачивания жидкости, маркировали мешок надписью «сформулированные ОИЛ» и извлекали мешок из БББ.

[001204] Добавляли мешок со сформулированными ОИЛ в устройство. После добавления ПЛ-2 соединяли сваркой мешок «сформулированные ОИЛ» с оставшейся иглой на устройстве.

[001205] Добавляли CS10. Переносили собранное устройство с подсоединенными мешками со сформулированными ОИЛ, CS-750 и CS-10 в БББ. ПРИМЕЧАНИЕ: мешок

CS-10 и все мешки CS-750 помещали между двумя охлаждающими пакетами, предварительно охлажденными до 2°C-8°C. Не помещать мешок со сформулированными ОИЛ на охлаждающие пакеты. Убеждались, что все зажимы на устройстве закрыты. Поворачивали запорный клапан так, чтобы шприц был закрыт.

[001206] Заменяли шприцы. Набирали ~10 мл воздуха в 100-мл шприц и заменяли 60-мл шприц на устройстве.

[001207] Добавляли CS10. Поворачивали запорный клапан так, чтобы линия к мешкам CS750 была закрыта. Открывали зажимы к мешкам CS-10 и набирали объем, рассчитанный, как описано выше, в шприц. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для добавления соответствующего объема CS-10. Закрывали зажимы к CS-10, открывали зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ и добавляли CS-10. Добавляли сначала 10,0 мл CS10 со скоростью примерно 10,0 мл/минуту. Добавляли остаток CS-10 с соответствующей скоростью 1,0 мл /сек. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для добавления соответствующего объема CS-10. Записывали время. ПРИМЕЧАНИЕ: целевой отрезок времени с момента первого добавления CS-10 до начала заморозки составляет 30 минут. Записывали каждый добавленный объем CS10 и общий добавленный объем. Закрывали все зажимы к мешкам CS10.

[001208] Готовили мешки CS-750. Поворачивали запорный клапан так, чтобы шприц был открыт. Открывали зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ и отбирали суспензию, останавливаясь непосредственно перед тем, как суспензия достигала запорного клапана. Закрывали зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ. Поворачивали запорный клапан так, чтобы он был открыт в сторону пустых мешков CS750 для конечного препарата. Используя новый шприц, отбирали как можно больше воздуха из мешков CS750 для конечного препарата, вытягивая воздух. Поддерживая давление на поршень шприца, закрывали зажимами мешки. Набирали ~20 мл воздуха в новый 100-мл шприц и соединяли с устройством. ПРИМЕЧАНИЕ: каждый мешок CS-750 для конечного препарата должен находиться между двумя охлаждающими пакетами для поддержания суспензии сформулированных ОИЛ холодной.

[001209] Распределяли клетки. Поворачивали запорный клапан так, чтобы линия к мешкам с конечным препаратом была закрыта. Отбирали объем, рассчитанный ранее, из мешка со сформулированными ОИЛ в шприц. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для получения нужного объема. Поворачивали запорный клапан так, чтобы линия к мешку со сформулированными ОИЛ была закрыта. Работая каждый раз с одним мешком для конечного препарата, вносили клетки в мешок для конечного препарата. Записывали объем клеток, добавленный в каждый из мешков CS750, описанных выше. Очищали линию воздухом из шприца так, чтобы клетки были вровень с верхом игольного порта. Закрывали зажим на заполненном мешке. Повторяли этапы с каждым мешком для конечного препарата, в промежутках осторожно перемешивая содержимое мешков со сформулированными ОИЛ. Записывали объем ОИЛ, помещенный

в каждый мешок для конечного препарата.

[001210] Удаляли воздух из мешков для конечного препарата и отбирали архивный образец. После заполнения последнего мешка для конечного препарата закрывали все зажимы. Набирали 10 мл воздуха в новый 100-мл шприц и заменяли шприц на устройстве. Работая каждый раз с одним мешком, отбирали весь воздух из каждого мешка с препаратом плюс объем препарата для архивного образца, определенный ранее. ПРИМЕЧАНИЕ: после отбора объема образца переворачивали шприц и использовали воздух для очистки линии к верхнему порту на мешке для препарата. Закрывали зажимом линию к мешку после отбора объема архивного образца и воздуха.

[001211] Записывали объем архивного образца, отобранный из каждого мешка.

[001212] Переносили архивный образец. Помещали архивный образец в 50-мл коническую пробирку, и маркировали пробирку надписью «архивный образец» и номером лота. Повторяли процедуру для каждого мешка.

[001213] Готовили конечный препарат для криоконсервирования. Используя кровоостанавливающий зажим, зажимали линии близко к мешкам. Удаляли шприц и закрывали красным колпачком крепление Люэра на устройстве, в котором находился шприц. Извлекали устройство из БББ. Запечатывали термосваркой (в соответствии с примечанием 5.12 к способу) на F, удаляя пустой мешок ретентата и мешки CS-10. ПРИМЕЧАНИЕ: сохраняли крепление Люэра для шприца на устройстве. Выбрасывали пустые мешки для ретентата и CS-10.

[001214] Маркировали мешки для конечного препарата. Прикрепляли этикетку для образца конечного препарата.

[001215] Готовили конечный препарат для криоконсервирования. Хранили криомешки на охлаждающем пакете или при 2-8°C до криоконсервирования.

[001216] Отбирали образец для подсчета клеток. Используя пипетку соответствующего размера, отбирали 2,0 мл архивного образца, извлеченного ранее, и помещали в 15-мл коническую пробирку для использования при подсчете клеток.

[001217] Выполняли подсчет клеток. Выполняли подсчет клеток и расчеты, используя NC-200. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавляли только один образец до соответствующего разведения, чтобы убедиться, что разведение было достаточным. Разбавляли дополнительные образцы с соответствующим коэффициентом разведения и продолжали процедуру подсчета. Записывали объемы образцов для подсчета клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении не было необходимости, «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0. Определяли среднюю концентрацию жизнеспособных клеток и определяли жизнеспособность клеток.

[001218] Выполняли расчеты для образца для проточной цитометрии. Выполняли расчеты, чтобы подтвердить достаточную концентрацию клеток для тестирования образца методом проточной цитометрии.

ТАБЛИЦА 44: Расчет концентрации клеток для проточной цитометрии

Концентрация	Целевой объем, необходимый для	$V \leq 1,0$ мл? (Да/Нет**)
--------------	--------------------------------	-----------------------------

жизнеспособных клеток А	6×10^7 ОКЖК $B = 6 \times 10^7$ клеток/А	
	мл	

[001219] Рассчитывали количество IFN- γ . Выполняли расчеты, чтобы подтвердить достаточную концентрацию клеток для тестирования образца на IFN- γ .

[001220] Запечатывали термосваркой. После определения объемов образцов запечатывали термосваркой мешки для конечного препарата как можно ближе к мешкам, для извлечения их из устройства.

ТАБЛИЦА 745: Маркировка и сбор образцов

Образец	Количество контейнеро в	Объем образца для добавления в каждый контейнер	Тип контейнера
*Микоплазма	1	1,0 мл	15-мл коническая пробирка
Эндотоксин	2	1,0 мл	2-мл криопробирка
Окраска по Грамму	1	1,0 мл	2-мл криопробирка
IFN-γ	1	1,0 мл	2-мл криопробирка
Проточная цитометрия	1	1,0 мл	2-мл криопробирка
**Вас-Т стерильность	2	1,0 мл	Вас-Т флакон
Архивный образец для КК	4	1,0 мл	2-мл криопробирка
Сателлитные флаконы	10	0,5 мл	2-мл криопробирка

[001221] Для получения образца для анализа микоплазмы добавляли объем сформулированной клеточной суспензии в 15-мл коническую пробирку, маркированную надписью «разбавитель для анализа микоплазмы», описанную выше. Стерильность и Вас-Т. Отбор образцов для анализа. В БББ отбирали 1,0-мл образец из собранного архивного образца клеточной суспензии, как описано выше, используя шприц соответствующего размера, и инокулировали в анаэробный флакон. Повторяли описанную выше процедуру для аэробного флакона.

[001222] Маркировали и хранили образцы. Маркировали инвентарными этикетками в соответствии с планом сбора образцов и хранили надлежащим образом до передачи. Переходили к следующим этапам криоконсервирования конечного препарата и образцов.

Криоконсервирование конечного препарата

[001223] Готовили морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки. Подтверждали настройки CRF перед замораживанием. Записывали информацию об оборудовании CRF. Выполняли криоконсервирование.

[001224] Настройка датчиков CRF. Прокалывали перегородку на мешке с пустой пробой для CRF. Вставляли 6-мл ампулу температурного датчика.

[001225] Помещали конечный препарат и образцы в CRF. Помещали мешок с пустой пробой в предварительно охлажденную кассету и переносили примерно в середину штатива CRF. Переносили кассеты с конечным препаратом в штатив CRF, и флаконы в штатив для флаконов CRF. Переносили штативы с препаратом и штативы с флаконами в CRF. Записывали время переноса препарата в CRF и температуру камеры.

[001226] Определяли время, необходимое для достижения температуры $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, и продолжали процесс в CRF. После того, как температура камеры достигала $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, начинали процесс заморозки. Записывали время.

[001227] Завершали процесс и хранили препараты. Останавливали CRF после завершения процесса заморозки. Извлекали кассеты и флаконы из CRF. Переносили кассеты и флаконы на хранение в паровую фазу LN_2 .

Пример 17: Получение препаратов ОИЛ, обогащенных специфическими для опухолевых антигенов Т-клетками с повышенной терапевтической активностью

[001228] Цель: получение препаратов ОИЛ, обогащенных специфическими для опухолевых антигенов Т-клетками с повышенной терапевтической активностью.

Вводная информация

[001229] Т-клетки, связанные со злокачественными лезиями, как правило, не функциональны и не способны контролировать/предотвращать рост опухоли (Schietinger et al. *Immunity* 2016). Все литературные источники, приведенные в данном примере, включены посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[001230] Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (ОИЛ) могут быть экстрагированы, активированы и размножены *ex vivo*, и могут индуцировать противоопухолевый ответ при повторной инфузии *in vivo* (Rosenberg et al. *Clin Cancer Res* 2011). Подход с применением адаптивной клеточной терапии, впервые примененный для пациентов, страдающих от метастатической меланомы, проходит тестирование для лечения других солидных опухолей. Сообщалось о клинической эффективности терапии ОИЛ при меланоме, раке головы и шеи, и раке шейки матки (SITC, 2017). Таким образом, специфические для опухоли ОИЛ могут быть извлечены из ингибирующей микросреды опухоли и модифицированы и/или размножены до количеств, достаточных для эффективной борьбы с опухолью.

[001231] Ретроспективный анализ клинических испытаний ОИЛ свидетельствует о том, что менее дифференцированные активные в отношении опухоли Т-клетки с устойчивой способностью к пролиферации и выживанию обладают превосходной противоопухолевой эффективностью в сравнении с эффекторными Т-клетками и эффекторными Т-клетками памяти, и что следующие поколения препаратов ОИЛ должны неизменно содержать повышенные уровни менее дифференцированных Т-клеток (Klebanoff et al. *J Immunother* 2012).

[001232] Стволовые Т-клетки памяти (TSCM) являются ранними

предшественниками испытывавших воздействие антигена центральных Т-клеток памяти; они обладают свойствами долгосрочной выживаемости, самообновления и мультипотентности, которые характерны для стволовых клеток; и, таким образом, считаются наиболее подходящими для создания эффективных препаратов ОИЛ. Показано, что TSCM обладают повышенной противоопухолевой активностью, в сравнении с другими подмножествами Т-клеток, в мышинных моделях адоптивного клеточного переноса (Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri et al. Blood 2013).

[001233] Необходимы стратегии, позволяющие смещать состав композиции ОИЛ в сторону более высокого содержания TSCM, для обеспечения оптимальной противоопухолевой активности.

[001234] Омоложение испытывавших воздействие антигена Т-клеток было достигнуто с использованием инструментов перепрограммирования, разработанных благодаря технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) (Nishimura et al. Cell Stem Cell 2012; Vizcardo et al. Cell Stem Cell 2012). Для данного подхода необходима дальнейшая *ex vivo* дифференциация iPSC в популяцию(и) Т-клеток, наиболее подходящих для борьбы с опухолью, представляющая собой длительный 2-этапный процесс, связанный с ограничением исходного репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR). Смотри также Stewart, et al. 538:183-192 (2016) касательно стратегий *in vitro* и *in vivo* доставки для внутриклеточной доставки материалов.

[001235] Показано, что сигнальные пути, включая Wnt, NOTCH, и Myb, способствуют созданию TSCM-подобных клеток непосредственно из необученных и/или испытывавших воздействие антигена Т-клеток (Gattinoni et al. Nat Med 2009, Kondo et al. Nat Comm 2017, Gautam et al. SITC 2017).

[001236] Для перепрограммирования судьбы клеток необходимо временное воздействие соответствующих транскрипционных факторов (ТФ). В случае ОИЛ это воздействие должно быть направлено на большую фракцию Т-клеток для сохранения происходящего из опухоли репертуара TCR.

[001237] Безвекторная микрофлюидная платформа SQZ представляет собой передовую стратегию внутриклеточной доставки; она продемонстрировала способность к доставке белков, включая транскрипционные факторы, в самые разные первичные человеческие клетки, включая Т-клетки (Sharei et al. PNAS 2013, а также Sharei et al. PLOS ONE 2015 и Greisbeck et al. The J of Immunology vol. 195, 2015). Смотри также международные патентные публикации WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 и WO 2017/123663A1, все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Такие способы, как те, которые описаны в международных патентных публикациях WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1 и WO 2017/123663A1, могут быть использованы с настоящим изобретением для воздействия на популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно

изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в популяции ОИЛ, таким образом, приводя к перепрограммированию популяции ОИЛ и увеличению терапевтической эффективности перепрограммированной популяции ОИЛ в сравнении с не перепрограммированной популяцией ОИЛ.

СТРАТЕГИЯ:

[001238] Предложено использование технологии SQZ для внутриклеточной доставки белков ТФ с целью сравнения способностей различных стратегий перепрограммирования приводить к получению препаратов ОИЛ, обогащенных специфическими для опухолевых антигенов Т-клетками с повышенной терапевтической активностью.

[001239] Рабочий план для охвата следующих аспектов/вопросов:

1. Тип(ы) опухоли
 - *меланома*
2. Оптимальные условия доставки
 - *оптимизированный протокол SQZ для человеческих Т-клеток+дополнительные условия*
 - *контроль эффективности доставки*
3. Выбор ТФ
 - TCF-1
 - NOTCH1/2 ICD
 - MYB
 - *+/- предварительный коктейль iPSC для «полного» перепрограммирования?*
4. Стадия активации/размножения, на которой модифицируют ОИЛ
 - *ПБР день 0*
 - *другие?*
5. Кинетика перепрограммирования
 - *дни 7, 11, 14, 18...*
6. Целевая подгруппа(ы) ОИЛ
 - *исходно суммарные*
 - *сортированные отдельные подгруппы (TCM, TEM, TEFF, TEMRA) для последующего сравнения.*
7. Необходимость в дополнительных факторах в среде для культивирования
 - IL7
 - RSPO3/WNT3A
 - *другие?*
8. Показатели
 - *детальное фенотипирование пре- и пост-ПБР ОИЛ с (модифицированными?) панелями 1, 2 и 3*
 - *оценка эффекторных функций пост-ПБР ОИЛ (анализы продуцирования*

цитокинов и/или маркеров активации)

- оценка реакционной способности в отношении опухоли пост-ПБР ОИЛ (анализы совместного культивирования клеток с аутологичной опухолью)

- анализы репертуара TCR (проточная цитометрия и/или РНК-сек)

- анализы метаболизма живых клеток, такие как Seahorse

- дополнительные соображения

9. Продуцирование белка ТФ

10. Получение опухоли

11. Логистика (транспортировка клеток)

Таблица 46: Процесс

Задачи
<p>Оптимизация условий доставки белков в ОИЛ:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Хранящиеся замороженные образцы пре-ПБР клеток из меланомы будут использованы для скрининга условий - Доставляемый тестируемый реагент будет..... - Условия будут включать..... - Показатели будут..... - Выбор условий будет подтвержден на 2-3 свежих пре-ПБР
<p>Продуцирование белков ТФ:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Будет определен поставщик и составлен контракт на продуцирование достаточного количества материалов для 10 экспериментов в масштабе мини-ПБР - ~7 выбранных белков ТФ будут получены с нужным уровнем чистоты
<p>Эксперименты по перепрограммированию:</p> <ul style="list-style-type: none"> - будут использованы минимум 6 замороженных и/или свежих пре-ПБР образцов, для которых доступна аутологичная опухолевая линия - будут доставлены следующие сочетания ТФ с использованием оптимизированного протокола SQZ <p>Коктейль iPSC</p> <p>TCF-1</p> <p>NOTCH1/2 ICD</p> <p>MYB</p> <ul style="list-style-type: none"> - будет получено подтверждение iPSC и предпринята попытка повторной дифференциации с использованием или опубликованных условий и/или SQZ доставки вышеуказанных ТФ - перепрограммирование ОИЛ будет контролироваться с течением времени методом проточной цитометрии

- будут проведены процессы мини-ПБР для каждого условия в течение 11 дней, с использованием потенциальных адъювантов в среде для культивирования
--

Фенотипическая оценка пост-ПБР ОИЛ

Функциональная оценка пост-ПБР ОИЛ

Пример 18: Способ криоконсервирования

[001240] В данном примере описан способ криоконсервирования для ОИЛ, полученных сокращенным закрытым способом, описанным в Примере 16, с использованием морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки CryoMed, модель 7454 (Thermo Scientific).

[001241] Используемое оборудование включает следующее: алюминиевый штатив для хранения кассет (совместимый с мешками для замораживания CS750), кассеты для криогенного хранения 750-мл мешков, резервуар с жидким азотом при пониженном давлении (22 psi), холодильник, датчик термопара (ленточного типа для мешков) и мешки для замораживания CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[001242] В способе замораживания используют скорость охлаждения 0,5°C в минуту от нуклеации до -20°C и скорость охлаждения 1°C в минуту до конечной температуры -80°C. Параметры программы являются следующими: этап 1 - ожидание при 4°C; этап 2: 1,0°C/мин (температура образца) до -4°C; этап 3: 20,0°C/мин (температура камеры) до -45°C; этап 4: 10,0°C/мин (температура камеры) до -10,0°C; этап 5: 0,5°C/мин (температура камеры) до -20°C и этап 6: 1,0°C/мин (температура образца) до -80°C.

[001243] Описание процедуры из данного примера приведено в сочетании со способом Примера 16.

Пример 19: Способ получения препаратов ОИЛ, обогащенных специфическими для опухолевых антигенов Т-клетками с повышенной терапевтической активностью

Фаза 1a: Приобретение одной валидированной сд-РНК для эффективного и специфического выключения генов

[001244] Начальная фаза будет включать приобретение одной валидированной сд-РНК для эффективного и специфического выключения 3 следующих генов: PD-1 (также известного как PDCD1), TIM3 и CBLB.

Фаза 1b: Идентификация последовательностей для эффективного выключения LAG3 и CISH

[001245] Вплоть до 20 сд-РНК будут разработаны для новых мишеней. Выключение генов будет оцениваться в клетках HeLa на экзогенных мишенях и в активированных первичных Т-клетках на эндогенных мишенях. Для интересующего гена будут выбраны один-два лучших варианта, которые снижают уровни экспрессии на более чем 80%, включая PD-1 и LAG-3. Будут созданы полностью модифицированные варианты выбранных сд-РНК.

[001246] Ожидается, что будут созданы одна-две LAG3- и CISH-специфические сд-

РНК. Две направляющие РНК для каждого из целевых генов являются предпочтительными.

Фаза 2: Валидация опосредованного сд-РНК выключения генов в пре-ПБР ОИЛ.

[001247] Будут использованы вплоть до 6 замороженных линий пре-ПБР из меланомы/других опухолей для валидации мишеней сд-РНК (включая PD-1, TIM3, SCLL, LAG3 и CISH). В вариантах экспериментов будут протестированы концентрации сд-РНК, периоды времени после размораживания, повторные/последовательные доставки, а также условия культивирования. Показателем будет % выключения генов при оценке методом проточной цитометрии и/или кПЦР. Влияние доставки РНК на рост и постоянство выключения генов ОИЛ с течением времени будет оценено в процессе размножения ОИЛ.

[001248] Ожидается, что в случае лучшего варианта(ов) будет достигнуто 80% выключение генов через 24 часа после сбора клеток в ПБР. Общее количество клеток будет в пределах 10% от необработанных контролей.

Фаза 3: Применение опосредованного сд-РНК выключения генов к способу 2А.

[001249] Выключение генов будет оптимизировано на 3-6 свежих препаратах ОИЛ в масштабе научного исследования. В вариантах экспериментов будут протестированы концентрации сд-РНК, периоды времени, повторные/последовательные доставки, а также условия культивирования. Показателем будет % выключения генов в пост-ПБР ОИЛ при оценке методом проточной цитометрии и/или кПЦР. Влияние выключения генов на фенотип и функции ОИЛ будет оценено в анализах методом проточной цитометрии. Необязательно, будут проведены эксперименты по восстановлению и/или анализу экспрессии генов для подтверждения специфичности эффектов (например, степени и влияния потенциального выключения нецелевых генов). По меньшей мере 2 пары мишень/сд-РНК будут выбраны для дальнейшей работы. Затем будут охарактеризованы фенотипы ОИЛ. Неспецифическая и специфическая активность ОИЛ, эквивалентная или более высокая, чем активность контрольных ОИЛ, будет оценена для определения оптимальной пары мишень/сд-РНК.

Фаза 4: Применение оптимизированного протокола(ов) выключения генов к полномасштабному получению ОИЛ.

Будет проведено одно полномасштабное получение ОИЛ для каждого гена-мишени. Будут разработаны препараты ОИЛ с новыми характеристиками, определенными в фазе 3, помимо тех, которые необходимы для выпуска препарата.

Пример 20: Получение и использование иллюстративной сд-РНК

Дизайн сд-РНК

[001250] Примерно 2-20 последовательностей сд-РНК будут созданы для конкретной мишени. В некоторых случаях последовательности сд-РНК будут выбраны на основании алгоритма выбора (коммерчески доступного от компании Advirna LLC, Worcester, MA, USA), разработанного на основе функционального скрининга более 500 последовательностей сд-РНК. Будет использован регрессионный анализ для установления корреляции между частотой встречаемости конкретного нуклеотида и модификаций в

любом конкретном положении в дуплексе сд-РНК с ее функциональностью в анализе подавления гена. Выбранные последовательности будут синтезированы на коммерческой основе (например, компанией TriLink Biotechnologies) в масштабе 0,2-мкмоль и растворены в стерильной свободной от РНКаз и ДНКаз воде для инъекций (коммерчески доступной от компании CalBiochem, 4.86505). Дуплексы могут быть отожджены путем нагревания при 95°C в течение 5 мин и последующего охлаждения до комнатной температуры.

Прямая доставка сд-РНК (пассивное поглощение)

[001251] Олигонуклеотиды, включая сд-РНК, нацеленные на гены, описанные в настоящем документе, могут быть растворены в бессывороточной среде и внесены в лунки 96-луночного планшета для культивирования в трех повторах. Клетки могут быть высеяны в соответствующей среде для культивирования клеток, содержащей уменьшенное количество ЭБМ, в планшет с предварительно разведенными соединениями на указанное количество времени. Клетки HeLa могут быть трансфицированы в среде EMEM с 3% ЭБС при плотности 10000 клеток/лунку. Первичные человеческие Т-клетки (AllCells, CA) могут быть культивированы в полной среде AIM-V (Gibco), содержащей 500 МЕ/мл IL2 (ProSpec). Клетки могут быть активированы анти-CD3/CD28 Dynabeads (Gibco, 11131) в соответствии с инструкциями производителя в течение по меньшей мере 4 дней до трансфекции. Т-клетки могут быть трансфицированы в 5% ЭБС при плотности 100000 клеток/лунку без удаления Dynabeads, если не указано иначе. Могут быть получены флуоресцентные изображения живых клеток, трансфицированных Су3-конъюгированной сд-РНК, с использованием микроскопа Olympus BX-60 для подтверждения эффективности трансфекции. Окрашивание ядер может быть выполнено с использованием красителя Hoechst 33342 (Molecular Probes, H1398), добавленного к трансфицированным клеткам на 30 минут, и изображения могут быть обработаны.

Идентификация лучшего варианта соединения сд-РНК

[001252] Лучшие варианты, описанные в Примере 18, можно идентифицировать при помощи данного протокола. Можно конструировать репортерную плазмиду с люциферазой путем вставки нацеленных на PDCD1 областей последовательности в плазмиду psiCheck2 (Promega, C8021) ниже последовательности люциферазы Renilla. Для сравнения, в качестве положительного контроля можно вставлять ранее валидированную последовательность сд-РНК для MAP4K4.

[001253] Для скрининга клетки HeLa можно трансфицировать клонированной плазмидой с использованием Fugene HD (Promega, E2311) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, можно высевать клетки при плотности $2,5 \times 10^6$ клеток/10-см² 390 чашку в среде EMEM (ATCC, 30-2003) без антибиотиков и трансфицировать через 6 часов плазмидой при соотношении FuGENE:ДНК, составляющем 2,5:1. Клетки можно инкубировать в течение 16-18 час, промывать 3 раза PBS, обрабатывать трипсином и высевать в 96-луночный планшет с предварительно разбавленными соединениями сд-РНК в конечной концентрации 1 мкМ сд-РНК/10000 клеток/100 мкл EMEM с 3% ЭБС. Клетки

можно обрабатывать сд-РНК в течение 48 ч, допуская пассивное поглощение клетками соединений, лизировать лизирующим буфером Glo (Promega, E266A) и анализировать на экспрессию люциферазы Renilla и светляков. Для этого 20-мкл аликвоты каждого лизата добавляют в двух повторах в непрозрачные 96-луночные планшеты и смешивают либо с буфером для анализа Мэтьюза (Renilla) 59 397, либо буфером для анализа люциферазы светляков 398 (25 мМ глицилглицин, 15 мМ MgSO₄, 4 мМ ЭГТА, 1 мМ ДТТ, 2 мМ АТФ, 15 мМ 399 K₂PO₄, pH 7,8 и 1 мМ D-люциферин). Субстраты D-люциферин (Promega, E1605) и h-коэлюцентеразин (NanoLight, 301) добавляют непосредственно перед использованием. Люминесценцию можно измерять на приборе SpectraMax i3 (Molecular Devices), нормировать (Renilla/Firefly) и выражать в виде процента от необработанного контроля.

Количественное определение мРНК методом кПЦР

[001254] Суммарную РНК можно выделять из трансфицированных клеток, используя набор для очистки PureLink™ Pro96 (Invitrogen, 12173-011A) в соответствии с рекомендациями производителя. Можно готовить разведения не трансфицированных (НТ) клеток 1:5 и 1:25 для построения стандартной кривой. Экспрессию генов анализируют методом одноэтапной мультиплексной кПЦР 407, смешивая 20-40 нг очищенной РНК с Quanta qScript RT-qPCR ToughMix (VWR, 89236672) и Taqman зондами - PDCD1-FAM (Taqman, Hs01550088_m1) и GAPDH-VIC (Applied Biosystems, 4326317E) в одной и той же реакции. Образцы можно амплифицировать с использованием рекомендованных условий Quanta на приборе для кПЦР StepOnePlus (Applied Biosystems). Экспрессию PDCD1 можно нормировать на GAPDH, соотносить со стандартной кривой и выражать в виде процента от клеток, трансфицированных нецелевым контролем (НЦК).

Анализ жизнеспособности клеток

[001255] Размноженные ОИЛ по настоящему изобретению можно трансфицировать олигонуклеотидами сд-РНК в разных дозах в течение 72 ч. Клетки промывают и инкубируют с разбавленным 1:10 реагентом CellTiter-Blue (Promega, G808A) в течение 1 ч при 37°C. Планшеты выдерживают при комнатной температуре, и флуоресценцию регистрируют при длине волны возбуждения 530 нм/длине волны эмиссии 590 нм. Линейность диапазона можно подтверждать, помещая 4 серии 2-кратных разведений клеток в те же условия и строя графики показателей флуоресценции.

Выделение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов

[001256] Опухоль-инфильтрирующие лимфоциты можно получать, как описано в настоящем документе, например, как показано на Фигуре 8, а также Фигуре 14.

Размножение ОИЛ

[001257] ОИЛ можно высевать во флаконы, как описано в настоящем документе, и проводить первый и/или второй этап размножения. Сд-РНК можно добавлять во время первого размножения, например, этапа В, после первого размножения, например, во время этапа С, до или во время второго размножения, например, до или во время этапа D, после этапа D и до сбора клеток на этапе E, в течение или после сбора клеток на этапе F, до или

во время окончательного формулирования и/или переноса в инфузионный мешок на этапе F, а также до любого необязательного этапа криоконсервирования на этапе F. Кроме того, сд-РНК можно добавлять после размораживания после любого этапа криоконсервирования на этапе F.

Анализ включения тимидина

[001258] Образец ОИЛ можно собирать во время любого из этапов размножения и высевать в тройном повторе на 96-луночный планшет (10^3 клеток/лунку) в среде CellGro с добавлением 2% человеческой АВ сыворотки. Через 1 час можно добавлять 1 мкКи/лунку [метил- ^3H] тимидина (PerkinElmer, Waltham, MA) в каждую лунку и инкубировать в течение четырех часов. Затем клетки можно собирать и определять включение ^3H -тимидина на жидкостном сцинтилляционном счетчике Trilux 1450 microBeta (Wallac), изучая рост ОИЛ.

Секреция IFN- γ обработанными сд-РНК клетками

[001259] Продуцирование IFN- γ стимулированными Т-клетками можно определять в супернатанте с использованием набора для ELISA человеческого IFN- γ (Mabtech) в соответствии с инструкциями производителя. ОИЛ можно готовить, как описано в настоящем документе, и обрабатывать, например, 2 мкМ сд-РНК в течение нескольких дней, в некоторых случаях четырех дней. После этого периода времени супернатант можно собирать для анализа ELISA с целью определения уровней продуцирования IFN- γ .

Обработка ОИЛ

[001260] ОИЛ, обработанные сд-РНК, можно использовать, как описано в настоящем документе, в способах лечения пациентов, страдающих от рака.

Пример 21: Иллюстративные методы электропорации

[001261] ОИЛ готовят в соответствии с любым из способов, описанных в настоящем документе. Будут протестированы следующие методы трансфекции: липофекция с липофектином и липофектаминам, электропорация с использованием прибора ВТХ ЕСМ 830 с прямоугольной волной или Bio-Rad Gene Pulser II, электропорация с экспоненциально убывающей амплитудой волны на приборе Eppendorf Multiporator, а также нуклеофектор Амаха. Все методы будут исходно основаны на рекомендациях производителей с возможностью модификации по мере необходимости. Протокол нуклеофекции Амаха может привести к максимальной эффективности трансфекции. Метод Амаха будет оптимизирован с использованием разных сочетаний одного из трех растворов (V, R и T) и 8 программ электропорации. Смотри также методы, описанные в патентной заявке США № 2016/0230188 и патенте США № 8859229, оба из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Электропорацию также можно проводить методом, описанным в публикации Menger et al., Cancer Res., 2016 Apr 15; 76(8):2087-93, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, с использованием системы Agile Pulse ВТХ (Harvard Apparatus). Клетки после электропорации можно размножать способами пре-ПБР и ПБР, описанными в другом разделе настоящего документа. Также можно использовать методы

электропорации, известные в данной области, такие как те, которые описаны в патентах США № 6010613 и 6078490, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Можно проводить оптимизацию импульсной электропорации с использованием описанных способов, применяя следующие программы или их модификации:

Программа	Группа 1				Группа 2				Группа 3			
	Импульсы	V	Длительность (мс)	Интервал (мс)	Импульсы	V	Длительность (мс)	Интервал (мс)	Импульсы	V	Длительность (мс)	Интервал (мс)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

[001262] Можно проводить электропорацию ОИЛ в кювете с зазором 0,4 см (для порядка примерно 10^6 клеток/мл) с примерно 20 мкг плазмид, кодирующих GFP, и контрольных плазмид pUC, используя разные программы или методы электропорации. Через примерно 24 часа после электропорации анализируют экспрессию GFP в электропорированных клетках методом проточной цитометрии для определения эффективности трансфекции. Минимальное напряжение, необходимое для введения плазмиды электропорацией в ОИЛ, указано ранее в публикации международной патентной заявки № WO 2014/184744 и публикации патентной заявки США № US 2013/0315884 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Пример 22: Протокол временной трансфекции для получения препаратов ОИЛ, обогащенных специфическими для опухолевых антигенов Т-клетками с повышенной терапевтической активностью

[001263] Эксперименты, описанные в данном примере, позволят изучить эффекты двух разных стратегий усовершенствования ОИЛ. Стратегия 1: Временная экспрессия IL-2 или связанной с мембраной формы IL-15 (мс-IL-15). Стратегия 2: NOTCH-опосредованное перепрограммирование ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления NOTCH-опосредованное перепрограммирование включает экспрессию мРНК внутриклеточного домена (ICD) NOTCH1 или NOTCH2. В некоторых вариантах осуществления NOTCH-опосредованное перепрограммирование включает экспрессию мРНК NOTCH лиганда DLL1.

[001264] Изучаемыми типами опухолей будут меланома, рак легкого, саркома, а также другие.

[001265] ОИЛ будут получены способами, описанными выше в настоящем

документе, в том числе, например, способом, описанным в Примере 16.

[001266] Молекулы РНК будут доставлены методами, описанными, например, в Примере 21 (смотри также методы, описанные в патентной заявке США № 2016/0230188 и патенте США № 8859229, оба из которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме).

[001267] Будут определены условия доставки, включая, например, валидацию реагентов мРНК, период времени временной трансфекции и перепрограммирования, согласованность времени электропорации с используемыми способами получения ОИЛ, эффективность (в то числе эффективность трансфекции) и масштабируемость.

[001268] Результаты экспериментов будут включать фенотип ОИЛ (проточная цитометрия), эффекторные функции ОИЛ (анализы продуцирования цитокинов), реакционную способность ОИЛ в отношении опухолей (анализы совместного культивирования с аутологичными клетками опухолей), анализ репертуара TCR (проточная цитометрия и/или РНК-сек) и метаболическое состояние ОИЛ (анализ метаболизма живых клеток, например, Seahorse) или любые другие параметры, описанные выше в настоящем документе.

Ожидаемые результаты:

[001269] Будут спланированы условия доставки, необходимые для достижения высокой экспрессии интересующего белка в пост-ПБР ОИЛ. Замороженные образцы пре-ПБР клеток из меланомы будут использованы для скрининга условий. Реагентом, доставляемым в экспериментах по оптимизации, будет мРНК GFP. В экспериментах будут протестированы несколько способов активации ОИЛ и протоколов электропорации. Показателями будут: жизнеспособность клеток и % GFP-положительных клеток относительно не подвергнутых электропорации контролей, при оценке методом проточной цитометрии. Выбранные условия будут подтверждены с использованием 2-3 свежих препаратов ОИЛ доступных видов опухолей. В некоторых вариантах осуществления эффективность трансфекции (ЭТ) может быть определена через примерно 3, 6, 9, 12, 15 и/или 18 часов после трансфекции методом активированной флуоресценцией сортировки клеток (FACS). В некоторых экспериментах трансфектанты можно дополнительно анализировать каждые 12-24 часа до того момента, когда GFP больше не будет поддаваться обнаружению. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность клеток можно определять методом исключения красителя трипанового синего. Ожидается, что данный протокол приведет к >80% жизнеспособности и >70 эффективности трансфекции.

[001270] мРНК человеческого IL-2 и мс-IL-15 будет получена и функционально протестирована. Будут использованы валидированные условия для трансфекции 6 культур ОИЛ из разных опухолей. Показателями будут: эффективность трансфекции, фенотип ОИЛ и эффекторные функции ОИЛ. Ожидается, что данный протокол приведет к >80% жизнеспособности, >70 эффективности трансфекции, фенотипам ОИЛ, сопоставимым или улучшенным в сравнении с контролем, а также значительно усиленным эффекторным

функциям ОИЛ.

[001271] Будут спланированы условия доставки, необходимые для перепрограммирования Т-клеток. Замороженные образцы пре-ПБР клеток из меланомы, хранящиеся в Iovance, будут использованы для скрининга условий. Доставляемым реагентом будет мРНК NOTCH1 или 2 ICD. В экспериментах будут протестированы несколько способов активации ОИЛ и протоколов электропорации. Показателями будут: жизнеспособность клеток, эффективность трансфекции и % содержание стволовых Т-клеток памяти (TSCM) относительно не подвергнутых электропорации контролей при оценке методом проточной цитометрии. Выбранные условия будут подтверждены с использованием 2-3 свежих препаратов ОИЛ доступных видов опухолей. Ожидается, что данный протокол приведет к >80% жизнеспособности, >70 эффективности трансфекции и значительному увеличению частоты встречаемости TSCM.

[001272] Эксперименты по перепрограммированию будут проведены на вплоть до 6 препаратах ОИЛ из разных опухолей, с использованием определенных выше условий трансфекции. Показателями будут: эффективность трансфекции, фенотип ОИЛ, репертуар TCR и эффекторные функции ОИЛ. Ожидается, что данный протокол приведет к значительному увеличению частоты встречаемости TSCM, что позволит поддерживать репертуар TCR подмножества TSCM относительно суммарных ОИЛ, а также позволит поддерживать усиленные эффекторные функции в сравнении с контролем.

Пример 23: Приобретение и валидация SD-RXRNA[®]

[001273] В настоящем примере приведены данные, относящиеся к конструктам sd-rxRNA[®] для 5 интересующих мишеней: PDCD1, TIM3, CBLB, LAG3 и CISH.

[001274] Фаза 1: Приобретение sd-rxRNA[®] для 5 интересующих мишеней.

[001275] Фаза 2: Валидация sd-rxRNA[®]-опосредованного выключения генов в пре-ПБР ОИЛ (8 недель).

[001276] Вплоть до 6 замороженных линий пре-ПБР из меланомы/других линий. Определение экспериментальных условий.

[001277] Показатели:

- % выключения генов: ожидается $\geq 80\%$
- постоянство выключения генов
- рост ОИЛ: ожидается в пределах 10% разницы с контролем
- функция ОИЛ: ожидается увеличение продуцирования цитокинов

[001278] Фаза 3: Применение sd-rxRNA[®]-опосредованного выключения генов в способе Gen 2 и/или 3 (3 месяца)

- 3-6 СВЕЖИХ препаратов ОИЛ в масштабах научного исследования
- те же показатели, которые указаны выше
- фенотип ОИЛ
- реакционная способность ОИЛ в отношении опухолей
- по меньшей мере 2 пары мишень/sd-rxRNA[®] будут выбраны для дальнейшей работы.

[001279] Фаза 4: Применение оптимизированного протокола(ов) выключения генов к полномасштабному препарату ОИЛ (8 недель).

- один полномасштабный препарат на каждый ген-мишень.

Обоснование:

[001280] В микросреде опухоли (МСО) ОИЛ экспрессируют несколько ингибирующих молекул, которые отрицательно регулируют их эффекторную функцию.

[001281] Функциональность может быть восстановлена при культивировании ОИЛ *ex vivo*, однако иммуносупрессия будет возникать вновь после повторной инфузии.

[001282] Обеспечение подавления ингибирующих путей Т-клеток в течение по меньшей мере нескольких дней после повторной инфузии может повышать эффективность действия ОИЛ.

[001283] Самодоставляемая ксРНК (*sd-rxRNA*[®]) является эффективным инструментом нокдауна генов Т-клеток. Смотри, например, Ligtenberg, et al., *Mol. Therapy*, 26(6):1482-1493 (2018).

Цель:

[001284] Восстановление эффекторных функций ОИЛ путем подавления ингибирующих путей.

Стратегия:

[001285] Временный нокдаун 1) PDCD1, 2) TIM3, 3) CBLB, 4) LAG3 и 5) CISH с использованием *sd-rxRNA*[®] во время протокола быстрого размножения. Особое внимание временному нокдауну PD1 с использованием *sd-rxRNA*[®] во время протокола быстрого размножения.

Процедура:

[001286] Валидация *sd-rxRNA*[®]-опосредованного выключения генов в ПБР ОИЛ (эффективность и постоянство нокдауна; жизнеспособность Т-клеток).

[001287] Влияние выключения генов на фенотип и функцию (реакционную способность в отношении опухоли) ОИЛ.

Сводные результаты

[001288] Добавление направленной *sd-rxRNA*[®] во время ПБР приводило к успешному нокдауну генов 3 из 5 мишеней, в том числе более чем 80% (>80%) нокдауну PD1.

- PD1: >80%

- TIM3: ~70%

- LAG3: ~70%

- CISH: ~40%

- CBLB: не поддается определению

[001289] PD1 KD (нокдаун) был связан с пониженной жизнеспособностью. PD1 KD был связан с пониженным размножением ОИЛ.

[001290] Значительные фенотипические изменения были связаны с PD1 и TIM3 KD, которые указывали на более высокий уровень активации (повышенная экспрессия

CD25, CCR7, CD56, 4-1BB и OX40). В частности, значительные фенотипические изменения были связаны с PD1 KD, которые указывали на более высокий уровень активации (повышенная экспрессия CD25, CCR7, 4-1BB и OX40, относительно НЦК контроля).

[001291] Ни одна из sd-rxRNA[®] не приводила к повышению секреции цитокинов в ответ на повторную стимуляцию (INF γ /IL-2/TNF α) в этих экспериментах. В частности, воздействие на ОИЛ PDCD1 sd-rxRNA[®] не приводило к увеличению мобилизации CD107a или секреции цитокинов (INF γ /IL-2/TNF α) в ответ на повторную стимуляцию. Смотри, например, Фигуру 54.

[001292] PD1 KD (нокдаун) приводил к увеличению способности ОИЛ к уничтожению клеток in vitro (смотри, например, Фигуру 49).

Методы:

- День 0: начало пре-ПБР. Добавление среды плюс IL-2.
- День 11: начало ПБР. Размороженные/свежие пре-ПБР+sd-rxRNA[®] (то есть, начато второе размножение) со средой, содержащей IL-2 плюс МКПК.
- День 14: замена среды+sd-rxRNA[®], с IL-2 (необязательно, ОКТ3 и питающие клетки (МКПК)); однако проводили только с IL-2 (например, sd-rxRNA[®] в среде с IL-2).
- День 17: замена среды+sd-rxRNA[®] (добавление дополнительной sd-rxRNA[®]) (например, sd-rxRNA[®] в среде с IL-2).
- День 21: замена среды+sd-rxRNA[®] (добавление дополнительной sd-rxRNA[®]) (например, sd-rxRNA[®] в среде с IL-2).
- День 22: сбор ОИЛ, как описано выше.

Подсчет клеток и определение жизнеспособности.

Определение эффективности KD (нокдауна) (кПЦР, проточная цитометрия).

Проведение анализа фенотипа для определения характеристик ОИЛ, как описано выше.

Определение маркеров активации (CD107a, IFN γ) (смотри, например, Фигуру 45, маркеры ингибирования/истощения, и Фигуру 46, IFN γ).

[001293] Данный эксперимент проводили на опухолях пяти типов: меланома, рак молочной железы, рак легкого, саркома и рак яичника, как показано на Фигуре 40.

Пример 24: Варианты осуществления Примера 23

[001294] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001295] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ может включать:

- (i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента;
- (ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции

ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ;

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, в дни 11-21, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ; и

(v) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (iv), в день 22 или позже; и

(vi) необязательно, перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (v) в инфузионный мешок.

[001296] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени.

[001297] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления

примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001299] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001300] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001301] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют

одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001302] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001303] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 25: Варианты осуществления Примера 23

[001304] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001305] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ может включать:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, в дни 11-21, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d) в день 22 или позже, при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы.

[001306] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

доставлены в концентрации примерно 3,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 4,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 5,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001309] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001310] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из

дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001311] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001312] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001313] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах

осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 26: Варианты осуществления Примера 23

[001314] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001315] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ лечения субъекта, страдающего от рака, и такой способ включает введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), и включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, в дни 11-21, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы;

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования;
и

(i) введение терапевтически эффективной дозы третьей популяции ОИЛ из инфузионного мешка на этапе (g) пациенту.

[001316] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001317] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,25 мкМ до примерно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к

[001323] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 27: Варианты осуществления Примера 23

[001324] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001325] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа может быть предложена популяция размноженных ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, при этом популяция размноженных ОИЛ представляет собой третью популяцию ОИЛ, получаемую способом, включающим:

(а) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(с) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству

клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного П-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, в дни 11-21, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (f) to (g) происходит без открывания системы; и

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

[001326] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001327] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления

последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 5,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001329] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001330] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001331] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17

и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001332] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001333] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 28: Варианты осуществления Примера 23

[001334] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления,

согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001335] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК, 0,5 мкМ сд-РНК, 0,75 мкМ сд-РНК, 1 мкМ сд-РНК, 1,25 мкМ сд-РНК, 1,5 мкМ сд-РНК, 2 мкМ сд-РНК, 5 мкМ сд-РНК или 10 мкМ сд-РНК, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLVB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы.

[001336] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001337] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,25 мкМ до примерно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 1,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к

и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001340] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001341] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001342] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001343] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК,

добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 29: Варианты осуществления Примера 23

[001344] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001345] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно,

антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (с) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 2 мкМ сд-РНК и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы.

[001346] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001347] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-

РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 2,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001348] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии PD-1. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 2,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001349] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001350] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В

некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 2,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001351] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,75 мкМ до примерно 2,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001352] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001353] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах

осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21, при этом концентрация добавленной сд-РНК составляет примерно 2 мкМ по меньшей мере в один день. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 30: Варианты осуществления Примера 23

[001354] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001355] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК, 0,5 мкМ сд-РНК, 0,75 мкМ сд-РНК, 1 мкМ сд-РНК, 1,25 мкМ сд-РНК, 1,5 мкМ сд-РНК, 2 мкМ сд-РНК, 5 мкМ сд-РНК или 10 мкМ

сд-РНК, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001356] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001357] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах

экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001359] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001360] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001361] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001362] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-

РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001363] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 31: Варианты осуществления Примера 23

[001364] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001365] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

- (a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;
- (b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(с) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК в дни 11-21, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(е) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (с) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (с) к этапу (h) происходят без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001366] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например,

используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 2,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 4,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 5,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001369] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют

одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001370] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001371] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001372] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001373] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК

(включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

ПРИМЕР 32: Варианты осуществления Примера 23

[001374] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001375] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК в дни 11-21, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и SBLB, а также их сочетаний;

(e) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для

получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (с) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001376] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001377] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-

вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001379] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001380] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001381] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из

дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001382] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001383] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 33: Варианты осуществления Примера 23

[001384] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001385] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа

предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLV, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001386] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001387] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,25 мкМ до примерно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно 0,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда

среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТЗ и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТЗ и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТЗ и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 34: Варианты осуществления Примера 23

[001394] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001395] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (с) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и SVLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001396] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001397] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В

экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 3,75 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 4,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 5,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 6,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 7,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 8,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001399] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001400] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют

одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001401] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001402] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001403] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных

концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

Пример 35: Варианты осуществления Примера 23

[001404] В соответствии со способами, описанными в Примере 23, описаны способы размножения ОИЛ в сочетании с временным изменением экспрессии белков. В данном примере описаны различные дополнительные варианты осуществления, согласующиеся со способами, описанными в Примере 23.

[001405] В некоторых вариантах осуществления вышеописанного способа предложен способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, который включает:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f), в том числе в дни 11-21, с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и СВLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (e) к этапу (h) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

[001406] В некоторых вариантах осуществления другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, представляют собой сд-РНК, включая, например, но без ограничения, sd-gxRNA[®]. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК в день 11, день 14, день 17 и/или день 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергаются воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001407] В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 70% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 75% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 80% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 85% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 90% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 95% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к 99% уменьшению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации от примерно 0,25 мкМ до примерно 10 мкМ, в некоторых вариантах осуществления от примерно 0,25 мкМ до примерно 4 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии гена-мишени, когда они доставлены в концентрации примерно

примерно 9,0 мкМ. В некоторых вариантах осуществления последовательности сд-РНК, используемые по изобретению, приводят к уменьшению экспрессии PD-1, когда они доставлены в концентрации примерно 10,0 мкМ. В любом из вышеописанных вариантов осуществления указанные концентрации могут быть определены применительно к среде культивирования ОИЛ до или после замены среды.

[001409] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 0,75 мкМ до примерно 3 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001410] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,0 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001411] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК от примерно 1,5 мкМ до примерно 2,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001412] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере два дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают воздействию сд-РНК по меньшей мере три дня из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ подвергают

воздействию сд-РНК все дни из дня 11, дня 14, дня 17 и/или дня 21 при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют одновременно с заменой среды при концентрации сд-РНК примерно 2 мкМ. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001413] В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 11, добавляют в среду, содержащую сд-РНК, IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и, необязательно, содержащую одно или более из IL-2, ОКТ3 и АПК (включая, например, МКПК). В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 14, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 17, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК, добавленную в день 21, добавляют в среду, содержащую сд-РНК и IL-2. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 14. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 17. В некоторых вариантах осуществления дополнительную сд-РНК добавляют в день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в одной и той же концентрации в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК добавляют в разных концентрациях в день 11, день 14, день 17 и день 21. В некоторых вариантах осуществления сд-РНК нацелена на PD-1.

[001414] Примеры, описанные выше, приведены, чтобы предоставить специалисту 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 заявки считают своим изобретением. Модификации вышеописанных способов осуществления изобретения, которые очевидны для специалистов в данной области, должны входить в объем прилагаемой формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в спецификации, являются показателями уровня квалификации специалистов в области, к которой относится настоящее изобретение.

[001415] Все заголовки и обозначения разделов использованы исключительно для ясности и для ссылок, и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области понимают полезность комбинирования различных аспектов из различных заголовков и разделов по мере необходимости в зависимости от объема и сущности изобретения, описанного в настоящем документе.

[001416] Все литературные источники, цитируемые в настоящем документе, включены посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в той же степени, как если было бы специально указано, что каждая отдельная публикация, или патент, или патентная заявка, индивидуально включена посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[001417] Множество модификаций и вариаций настоящей заявки можно осуществлять без отклонения от сущности и объема изобретения, как очевидно для специалистов в данной области. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в настоящем документе, приведены лишь в качестве примера, и объем заявки ограничен лишь рамками прилагаемой формулы изобретения, наряду с полным объемом эквивалентов, основанием для которых является настоящая формула изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(i) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента;

(ii) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ;

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 100 раз по количеству клеток вторую популяцию ОИЛ, и при этом второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ; и

(iv) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий:

(v) проведение дополнительного второго размножения до или после этапа (iv) путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, дополнительного ОКТ-3 и дополнительных АПК, при этом дополнительное второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней, с получением большей терапевтической популяции ОИЛ, чем популяция, полученная на этапе (iii), при этом большая терапевтическая популяция ОИЛ отличается изменением количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток.

3. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству

клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного П-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы.

4. Способ по п. 3, дополнительно включающий этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, на этапе (f) с использованием способа криоконсервирования.

5. Способ по п. 4, при этом способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

6. Способ по п. 4, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

7. Способ по п. 6, при этом МКПК являются облученными и аллогенными.

8. Способ по п. 6, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

9. Способ по п. 6, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

10. Способ по п. 3, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

11. Способ по п. 3, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

12. Способ по п. 3, при этом множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

13. Способ по п. 3, при этом множество фрагментов включают от примерно 30 до

примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 мм³ до примерно 1500 мм³.

14. Способ по п. 13, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм³.

15. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

16. Способ по п. 3, при этом среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

17. Способ по п. 3, при этом среда для культивирования клеток на этапе (d) дополнительно содержит IL-15 и/или IL-21.

18. Способ по любому из пунктов 1-17, при этом концентрация IL-2 составляет от примерно 10000 МЕ/мл до примерно 5000 МЕ/мл.

19. Способ по п. 17, при этом концентрация IL-15 составляет от примерно 500 МЕ/мл до примерно 100 МЕ/мл.

20. Способ по п. 17, при этом концентрация IL-21 составляет от примерно 20 МЕ/мл до примерно 0,5 МЕ/мл.

21. Способ по п. 3, при этом инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой НуроThermosol-содержащий инфузионный мешок.

22. Способ по п. 5, при этом среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

23. Способ по п. 22, при этом среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% ДМСО.

24. Способ по п. 3, при этом каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

25. Способ по п. 3, при этом каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

26. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

27. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

28. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 15 дней до примерно 20 дней.

29. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

30. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

31. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее.

32. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 20 дней или менее.

33. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 15 дней или менее.

34. Способ по п. 3, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 10 дней или менее.

35. Способ по п. 5, при этом этапы (а) - (f) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

36. Способ по любому из пунктов 3-35, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (е), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

37. Способ по п. 36, при этом количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3 \times 10^{10}$ до примерно $13,7 \times 10^{10}$.

38. Способ по любому из пунктов 3-37, отличающийся тем, что этапы (b) - (е) проводят в одном контейнере, при этом проведение этапов (b) - (е) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль в сравнении с проведением этапов (b) - (е) в более чем одном контейнере.

39. Способ по любому из пунктов 3-38, при этом антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

40. Способ по любому из пунктов 3-39, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенным по меньшей мере в пять раз, или более, продуцированием интерферона-гамма при введении субъекту.

41. Способ по любому из пунктов 3-40, при этом риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

42. Способ по любому из пунктов 3-41, при этом ОИЛ из этапа (f) или (g) вводят инфузией пациенту.

43. Способ по любому из пунктов 3-42, при этом множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

44. Способ лечения субъекта, страдающего от рака, включающий введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающий:

(а) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(с) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (с) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей

популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (с) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(е) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (е) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (е) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (е) в (f) происходит без открывания системы;

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования; и

(i) введение терапевтически эффективной дозы третьей популяции ОИЛ из инфузионного мешка на этапе (g) пациенту.

45. Популяция размноженных ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, при этом популяция размноженных ОИЛ представляет собой третью популяцию ОИЛ, получаемую способом, включающим:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у субъекта, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(с) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (b) к этапу (с) происходит без открывания системы;

(d) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере,

имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (с) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(е) воздействие на вторую и/или третью популяцию ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ;

(f) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (е) к этапу (f) происходит без открывания системы; и

(g) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (е) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (f) to (g) происходит без открывания системы; и

(h) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

46. Популяция ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, по п. 44 или 45, при этом способ дополнительно включает один или более из признаков по любому из пунктов 1-43.

47. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий воздействие на ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, для получения терапевтической популяции ОИЛ, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают увеличение экспрессии опухолевых антигенов и/или увеличение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

48. Способ по любому из пунктов 1-47, при этом временное изменение экспрессии белков приводит к индукции экспрессии белков.

49. Способ по любому из пунктов 1-48, при этом временное изменение экспрессии белков приводит к уменьшению экспрессии белков.

50. Способ по п. 49, при этом одну или более сд-РНК используют для временного уменьшения экспрессии белков.

51. Способ оценки транскрипционных факторов (ТФ) и/или других молекул, способных временно изменять экспрессию белков, включающий размножение опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, воздействие на ОИЛ транскрипционными факторами (ТФ) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков, для получения терапевтической популяции ОИЛ, при этом ТФ и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают изменение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических для опухолевых антигенов Т-клеток в терапевтической популяции ОИЛ.

52. Способ по любому из пунктов 1-51, при этом временное изменение экспрессии белков направлено на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CBLB

(CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), IL-2, IL-12, IL-15, IL-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, TGF β , CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP1- β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и цАМФ-зависимой протеинкиназы А (РКА).

53. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (h) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап стерильной электропорации включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний.

54. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа стерильной электропорации или этапа SQZ микрофлюидного разрыва мембран на второй популяции ОИЛ, при этом этап стерильной электропорации или этап SQZ микрофлюидного разрыва мембран опосредует перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (h) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап электропорации включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), а также их сочетаний, и, кроме того, при этом молекулу адгезии, выбранную из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, а также их сочетаний, вводят методом гамма-ретровирусной или лентивирусной трансдукции в первую популяцию ОИЛ, вторую популяцию ОИЛ или собранную популяцию ОИЛ.

55. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной малой интерферирующей РНК или одной матричной РНК;

(f) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(g) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного ИЛ-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (f) к этапу (g) происходит без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (g), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(i) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (h) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования,

при этом этап стерильной электропорации включает доставку малой интерферирующей РНК для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний.

56. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем деления образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(e) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (h) происходят без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

57. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) создание контакта первой популяции ОИЛ с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(e) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на первой популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(f) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(h) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую

поверхность, и при этом переход от этапа (g) к этапу (h) происходит без открывания системы;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переход от этапа (h) к этапу (i) происходит без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

58. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переходы от этапа (c) к этапу (f) происходят без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f) с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации 0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды или

10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ/100 мкл среды, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (g) к этапу (i) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (i) в (j) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

59. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента, путем разделения образца опухоли, полученного от пациента, на множество опухолевых фрагментов;

(b) добавление опухолевых фрагментов в закрытую систему;

(c) проведение первого размножения путем культивирования первой популяции ОИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, с получением второй популяции ОИЛ, при этом первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом первое размножение проводят в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ОИЛ, и вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы;

(e) пребывание второй популяции ОИЛ в покое в течение примерно 1 дня;

(f) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, антитела ОКТ-3, необязательно, антитела ОХ40 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы;

(g) создание контакта второй популяции ОИЛ во время любого из этапов (d), (e) и/или (f) с по меньшей мере одной сд-РНК, при этом сд-РНК добавляют в концентрации

0,1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 0,75 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,25 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 1,5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 2 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, 5 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ или 10 мкМ сд-РНК/10000 ОИЛ, и при этом сд-РНК предназначена для ингибирования экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, а также их сочетаний;

(h) необязательно, проведение этапа стерильной электропорации на второй популяции ОИЛ, при этом на этапе стерильной электропорации происходит перенос по меньшей мере одной сд-РНК;

(i) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапах (g) или (h), с получением собранной популяции ОИЛ, при этом переходы от этапа (e) к этапу (h) происходят без открывания системы, при этом собранная популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ;

(j) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (i) в инфузионный мешок, при этом перенос из этапа (h) в (i) происходит без открывания системы; и

(k) криоконсервирование собранной популяции ОИЛ с использованием содержащей диметилсульфоксид среды для криоконсервирования.

60. Способ по любому из пунктов 56-59, при этом сд-РНК добавляют к первой популяции клеток два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней в течение первого периода размножения.

61. Способ по любому из пунктов 56-59, при этом сд-РНК добавляют ко второй популяции клеток два раза в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней в течение первого периода размножения.

62. Способ по любому из пунктов 56-61, при этом две сд-РНК добавляют для ингибирования экспрессии двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB.

63. Способ по любому из пунктов 56-61, при этом две сд-РНК добавляют для ингибирования экспрессии двух молекул, при этом две молекулы выбирают из групп, состоящих из:

- i. PD-1 и LAG-3,
- ii. PD-1 и TIM-3,
- iii. PD-1 и CISH,
- iv. PD-1 и CBLB,
- v. LAG-3 и TIM-3,
- vi. LAG-3 и CISH,
- vii. LAG-3 и CBLB,
- viii. TIM-3 и CISH,
- ix. TIM-3 и CBLB, и
- x. CISH и CBLB.

64. Способ по любому из пунктов 56-62, при этом добавляют более двух сд-РНК для ингибирования экспрессии более чем двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB.

65. Способ по любому из пунктов 56-64, при этом экспрессия по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, уменьшается на по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% в ОИЛ, контактировавших с по меньшей мере одной сд-РНК.

66. Способ по любому из пунктов 56-64, при этом экспрессия по меньшей мере одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, уменьшается на по меньшей мере 80%, 85%, 90% или 95% на по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 24 часа или по меньшей мере 48 часов в ОИЛ, контактировавших с по меньшей мере одной сд-РНК.

67. Способ по любому из пунктов 56-64, при этом сд-РНК получают способом, включающим проведение *in vitro* транскрипции с линейной двухцепочечной ДНК-матрицы, полученной методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и подходящей для *in vitro* транскрипции сд-РНК, содержащей от 5' к 3'-концу: промотор РНК-полимеразы на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, 5'-нетранслируемую область длиной менее 3000 нуклеотидов и эффективную для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, открытую рамку считывания, кодирующую полипептид, при этом полипептид является гетерологичным для клетки, которая будет трансфицирована, и при этом полипептид выбирают из группы, состоящей из лиганда или рецептора иммунной клетки, полипептида, который стимулирует или ингибирует функцию иммунной системы, и полипептида, который ингибирует функцию онкогенного полипептида, 3'-нетранслируемую область, эффективную для трансляции мРНК в поддающийся обнаружению полипептид после трансфекции в эукариотическую клетку, и поли(А) участка из 50-5000 нуклеотидов на кодирующей цепи двухцепочечной ДНК, при этом промотор является гетерологичным для открытой рамки считывания, и при этом ДНК-матрица не содержится в ДНК-содержащем векторе и заканчивается 3'-концом поли (А) участка.

68. Способ по п. 67, при этом промотор РНК-полимеразы содержит консенсусную последовательность связывания для РНК-полимеразы, выбранной из группы, состоящей из РНК полимеразы T7, T3 или SP6.

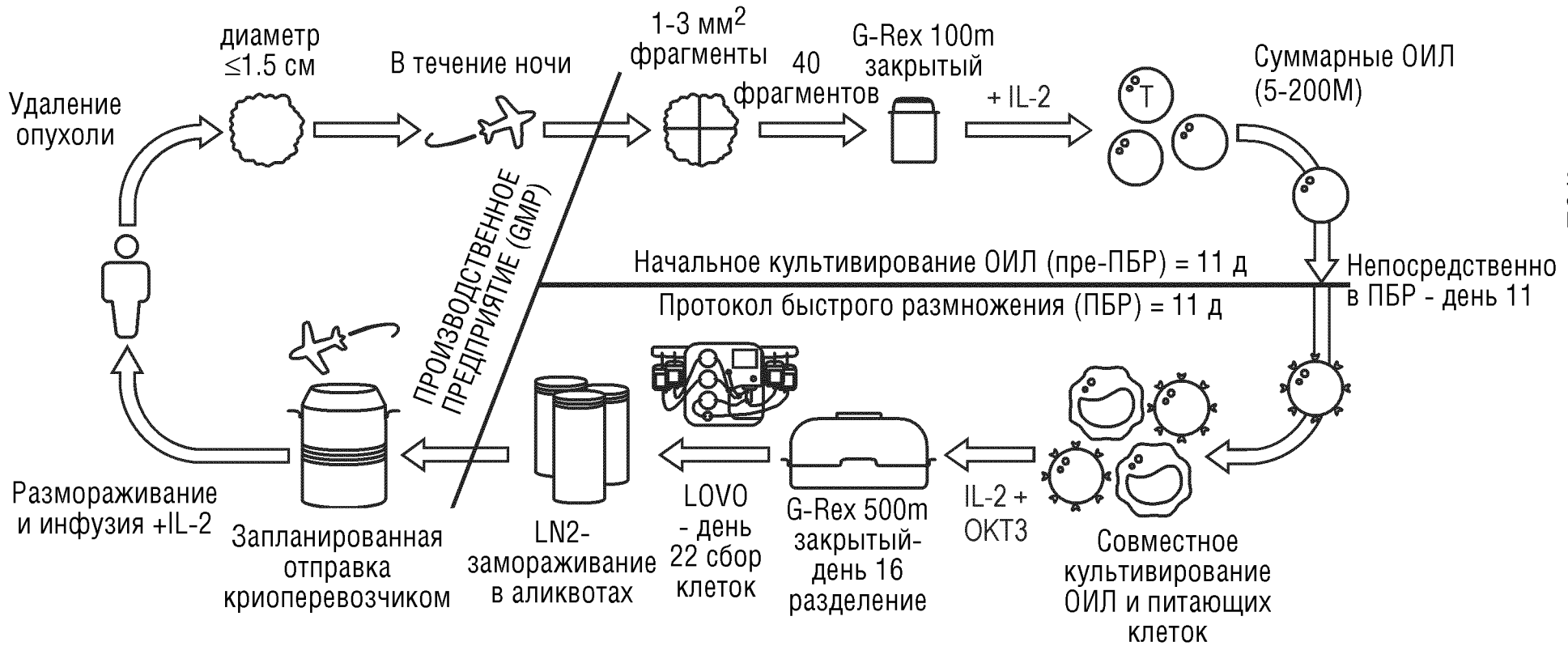
69. Способ по п. 67, при этом открытая рамка считывания кодирует полипептид, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB.

70. Способ по п. 67, при этом линейная двухцепочечная ДНК-матрица дополнительно содержит внутренний участок связывания рибосомы.

По доверенности

ФИГ.1

Способ 2А - 22 дня процесс, 2-3 дня сбор клеток/отправка



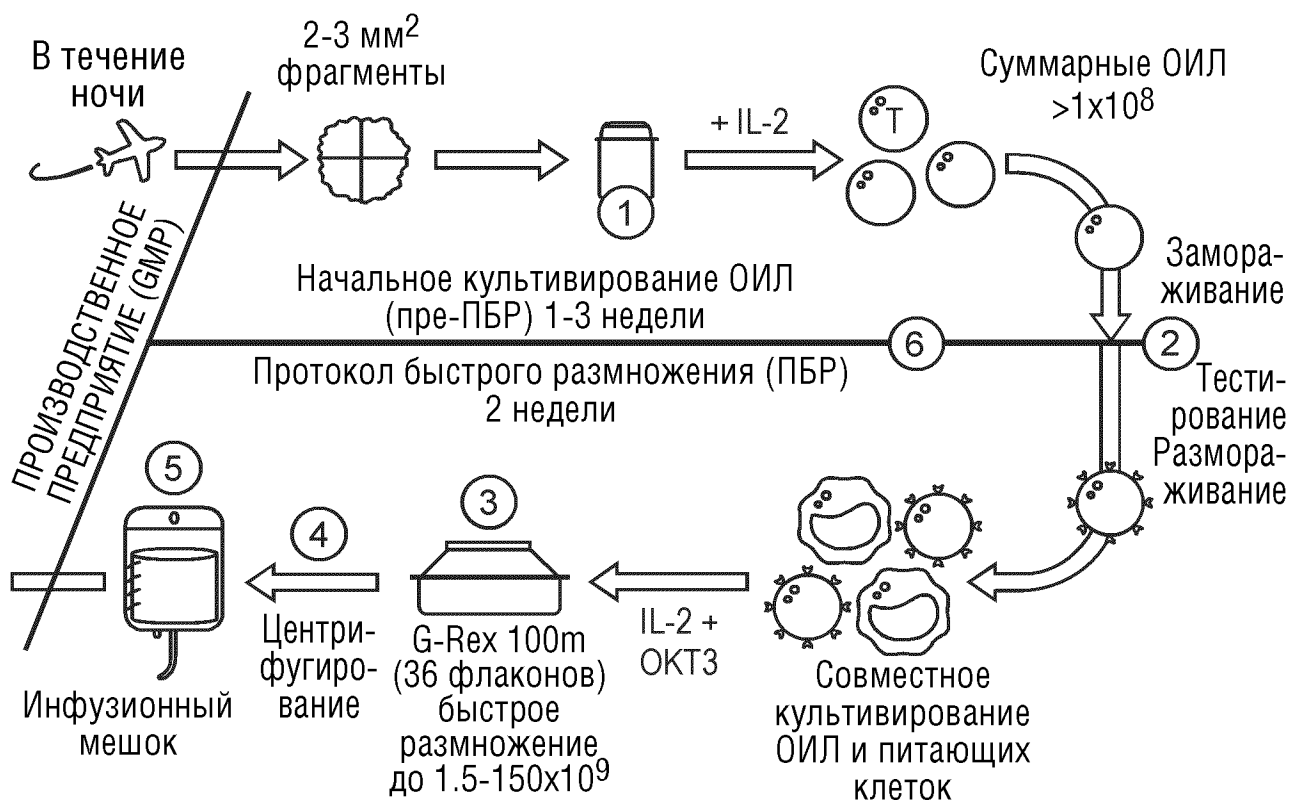
1/62

563970

ФИГ.2

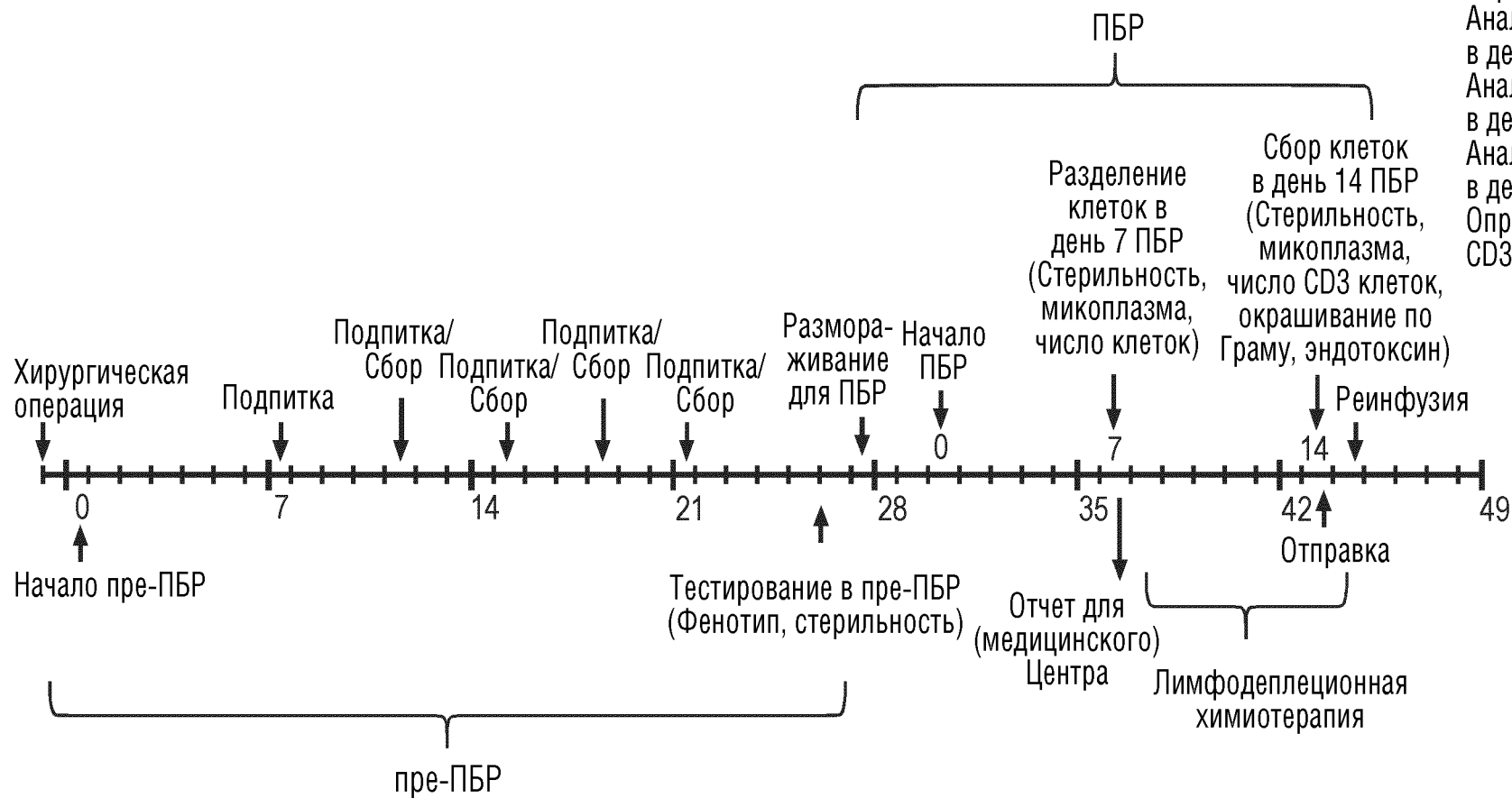
Разработка процесса

Этап	Современный способ-1С	Новый способ-2А	Изменение
1	4 фрагмента/10 G-Rex 10-21 день	40 фрагментов/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 дней	Больше образцов опухоли/ контейнер, сокращение времени культивирования, сокращение количества этапов, возможность использования с закрытой системой
2	Пре-ПБР замораживание-> тестирование -> размораживание - ~день 27- >40e6 ОИЛ	Непосредственно в ПБР- день 11-<200e6	Сокращение процесса, сокращение количества этапов, отказ от тестирования
3	36 G-Rex 100~~день 30 >5e6 ОИЛ - разделение ~день 36	4-5 G-Rex 500CS- ОИЛ- разделение день 16	Сокращение количества этапов, закрытая система, сокращение ПБР
4	Сбор клеток день ~43+ Сбор клеток центрифугированием	Сбор клеток день 22 LOVO- автоматизированная система промывания клеток	Сокращение количества этапов, автоматизированная, закрытая система
5	Свежий препарат- Hypothermosol-один инфузионный мешок	Криоконсервированный препарат-CS10 в LN ₂ , множество аликвот	Гибкость условий транспортировки, расписания лечения пациента, облегчение тестирования выпускаемого препарата, исследования в мировом масштабе
6	Длительность процесса 43+ дней	Длительность процесса 22 дня	Сокращение сроков ожидания для пациента, увеличение пропускной способности чистых помещений, стоимость препарата



ФИГ.3

План-график- способ 1С- современный способ



Выпуск на основании результатов:

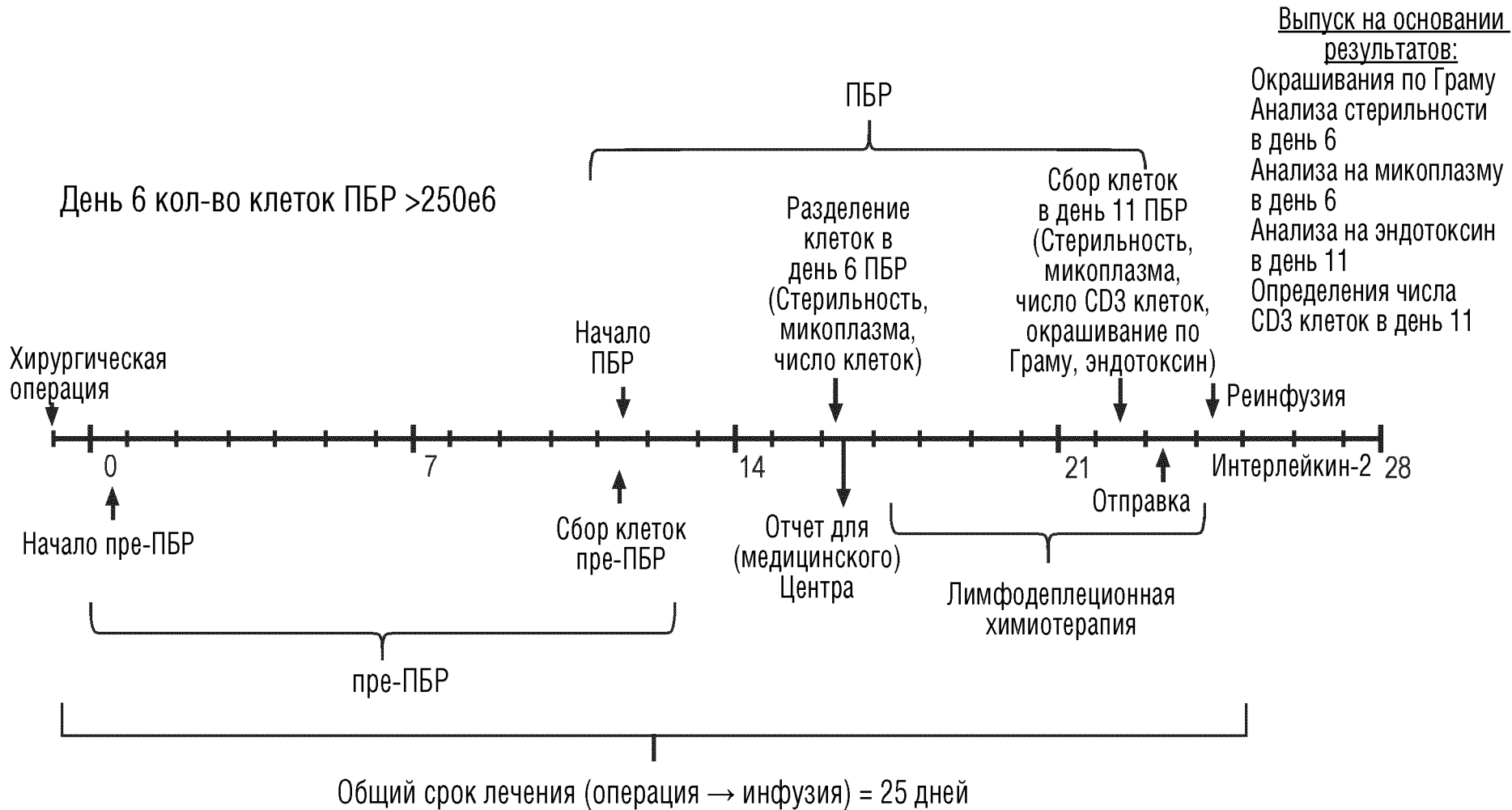
Окрашивания по Граму
Анализа стерильности
в день 7
Анализа на микоплазму
в день 7
Анализа на эндотоксин
в день 14
Определения числа
CD3 клеток в день 14

3/62

Лимфодеплеционная
химиотерапия

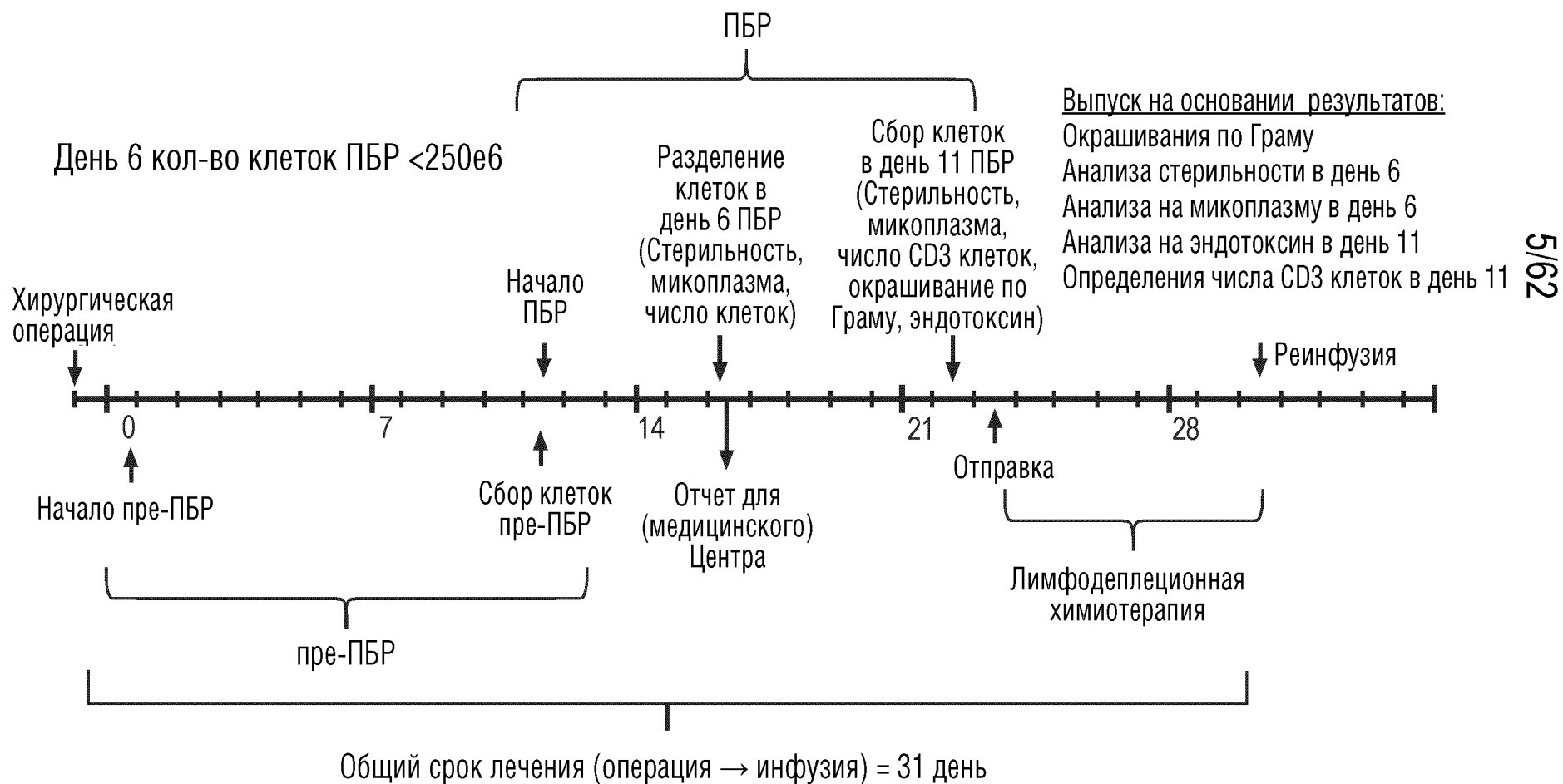
ФИГ.4

План-график ОИЛ-терапии- v2A- день 16 ПБР >250e6

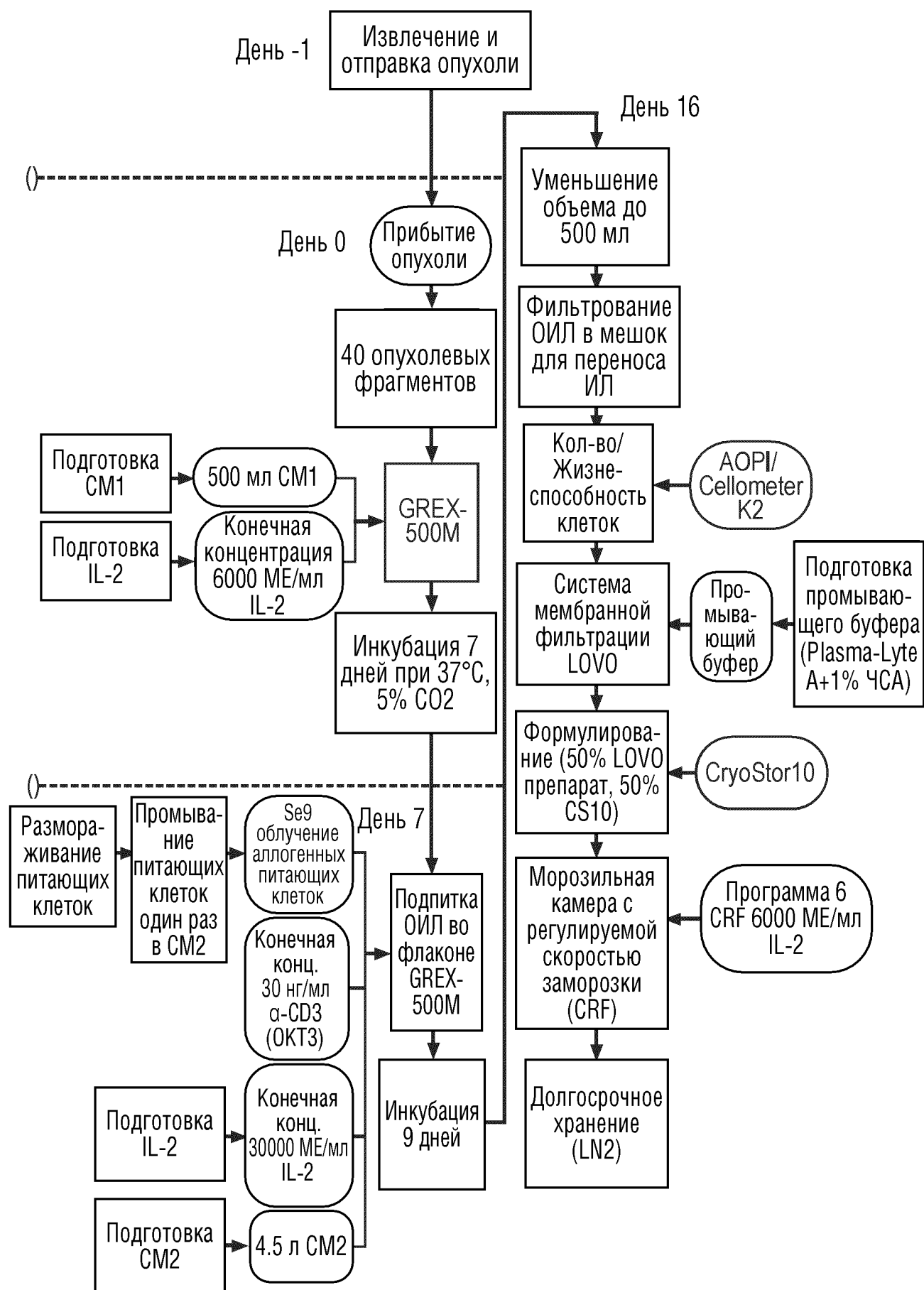


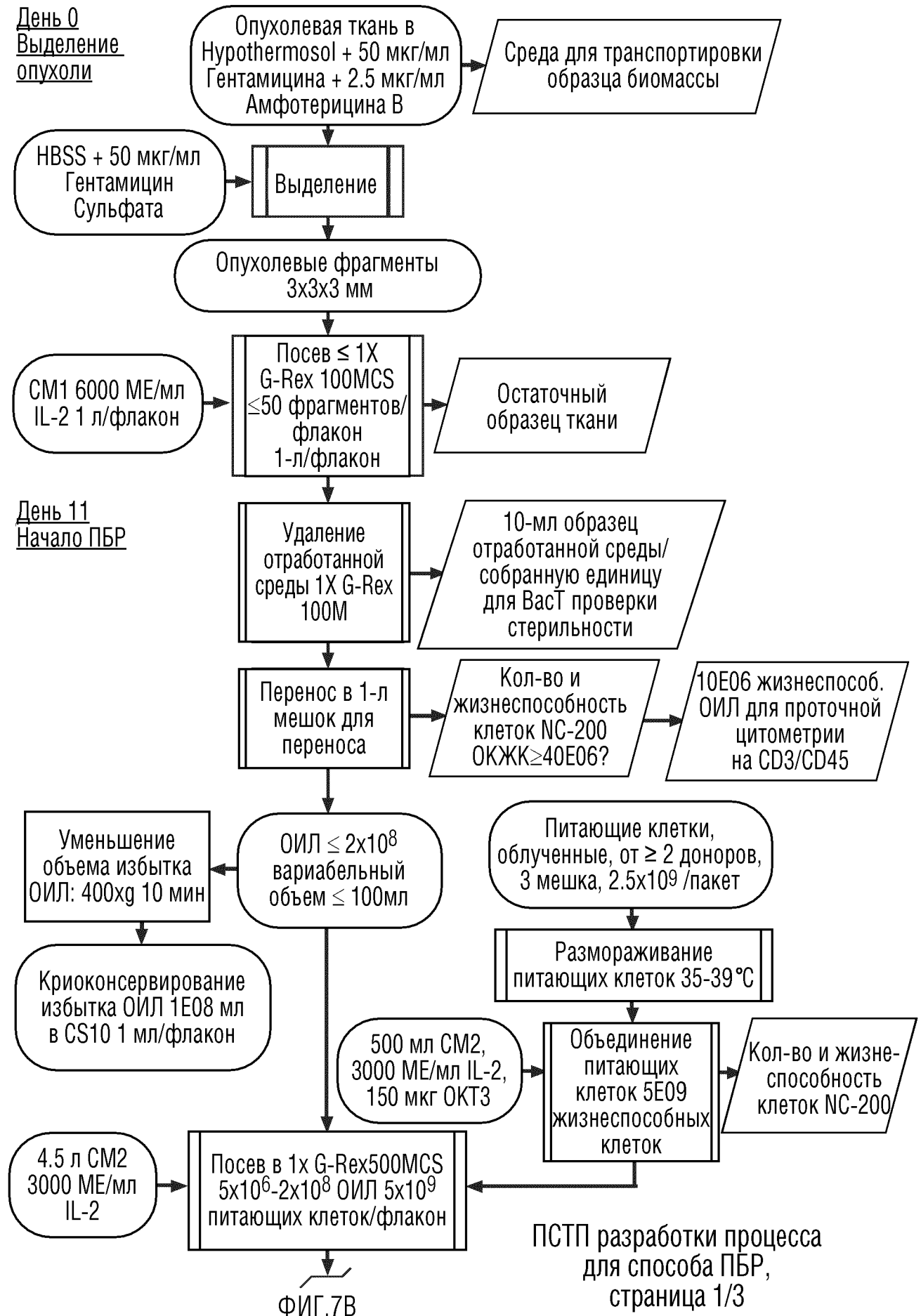
ФИГ.5

План-график ОИЛ-терапии- v2A- день 16 ПБР >250e6



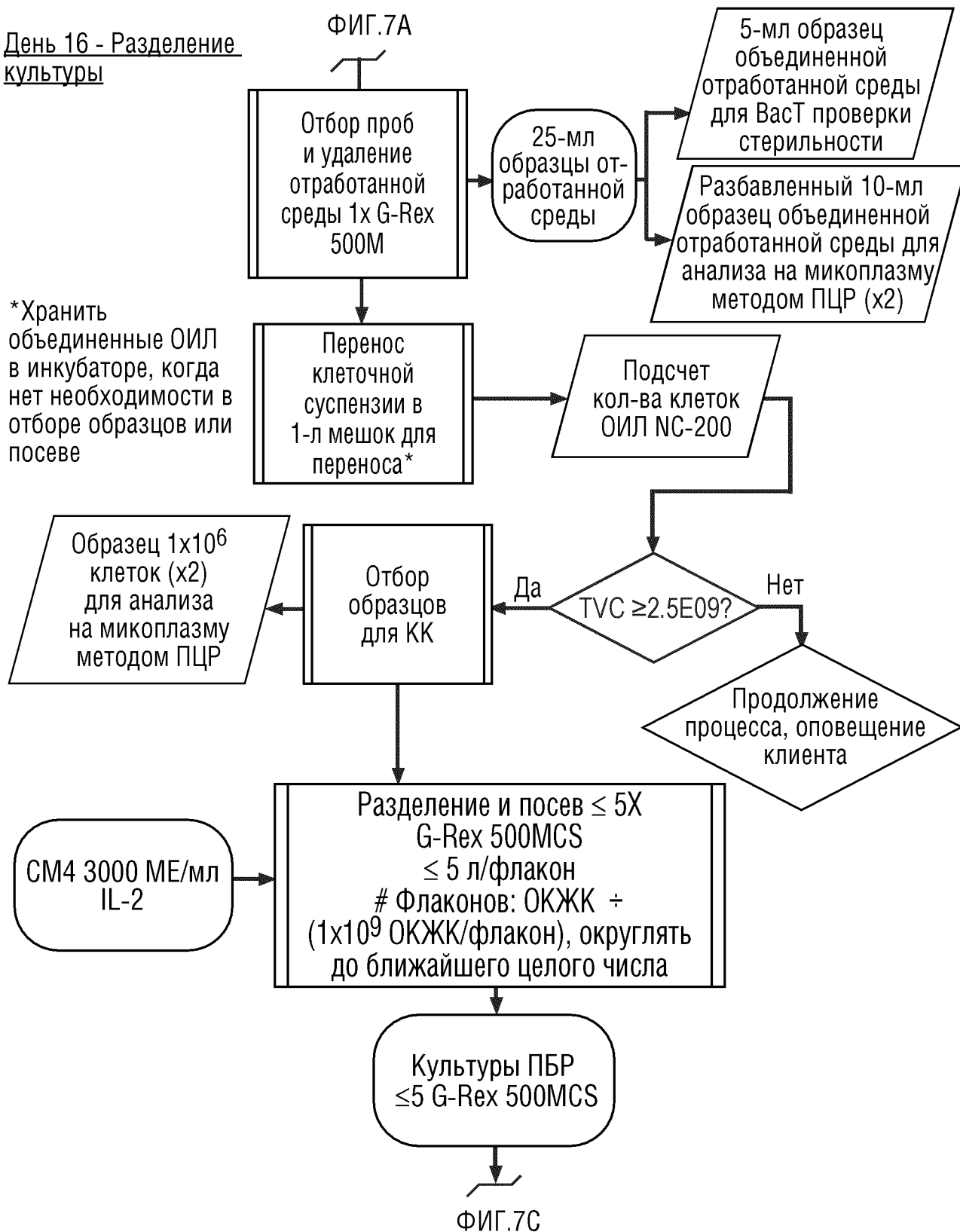
ФИГ.6





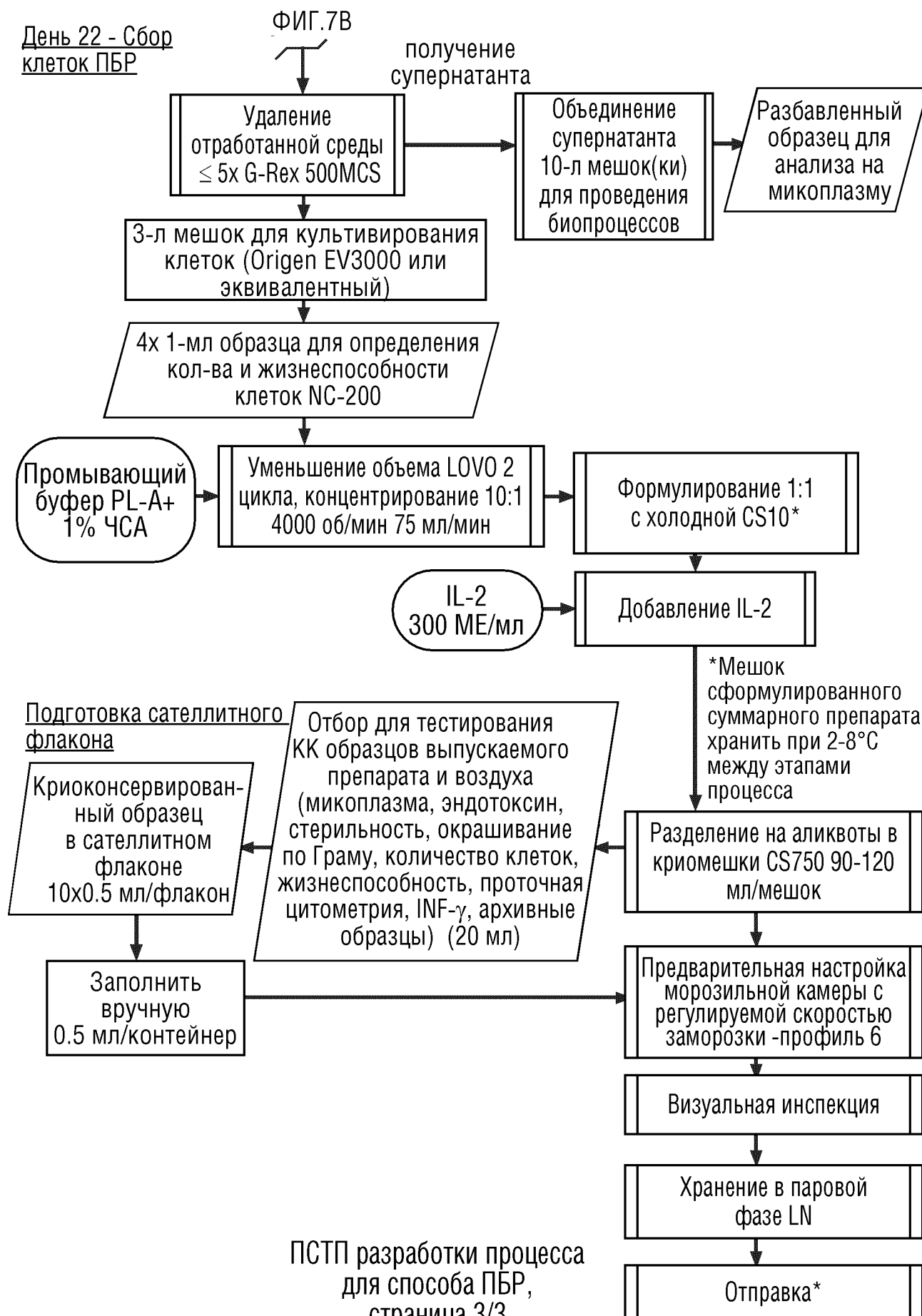
ФИГ.7В

День 16 - Разделение культуры



ФИГ.7С

День 22 - Сбор
клеток ПБР



ФИГ.8

Способ 2А: примерно 22 дня на этапы А-Е

1. Этап А

Получение образца опухоли пациента

2. Этап В

Фрагментирование и первое размножение
от 3 дней до 14 дней

3. Этап С

Переход от первого размножения
ко второму размножению
Отсутствие хранения и закрытая система.

4. Этап D

Второе размножение
L-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие питающие клетки
Закрытая система

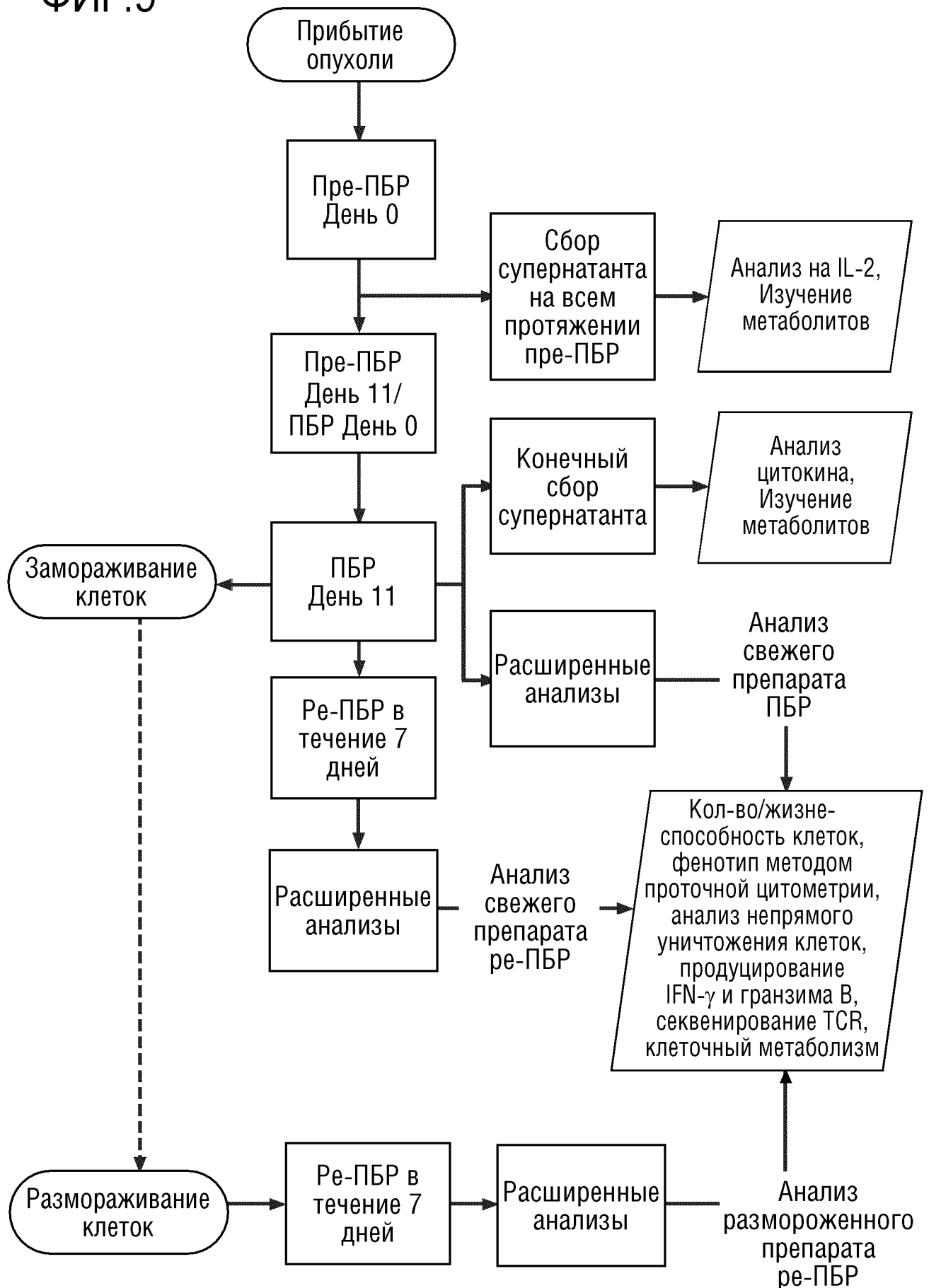
5. Этап Е

Сбор ОИЛ из этапа D
Закрытая система

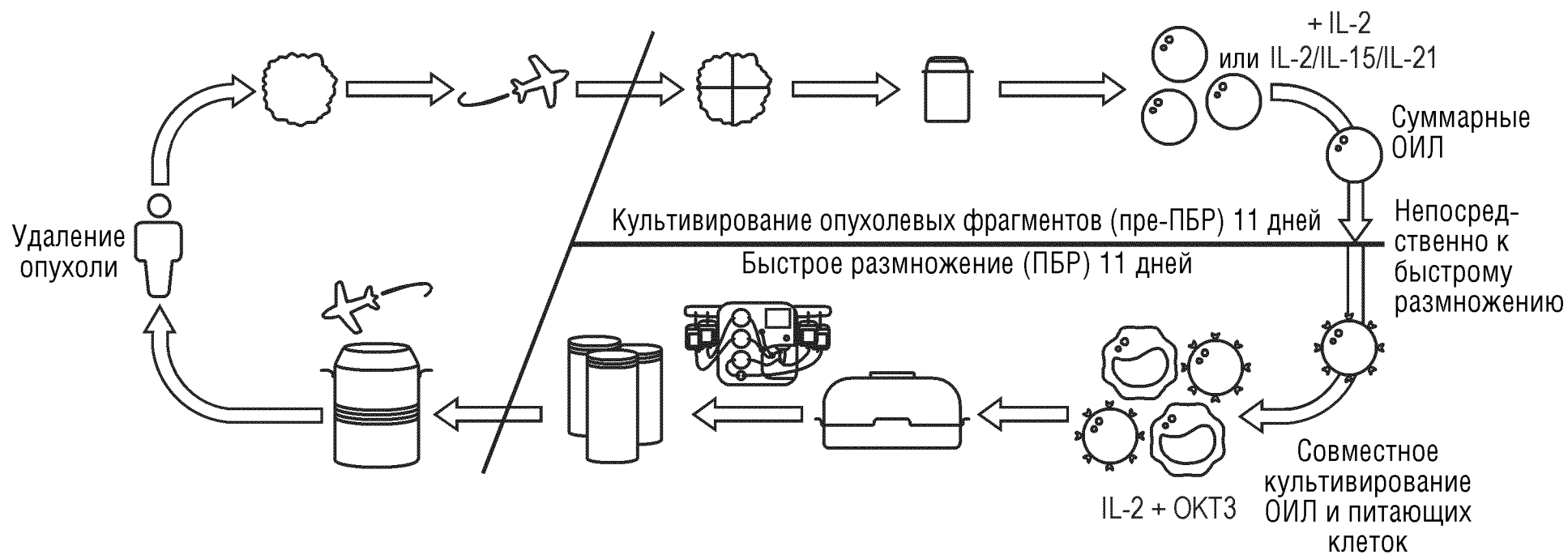
6. Этап F

Окончательное формулирование и/или перенос
в инфузионный мешок
(необязательно, криоконсервирование)

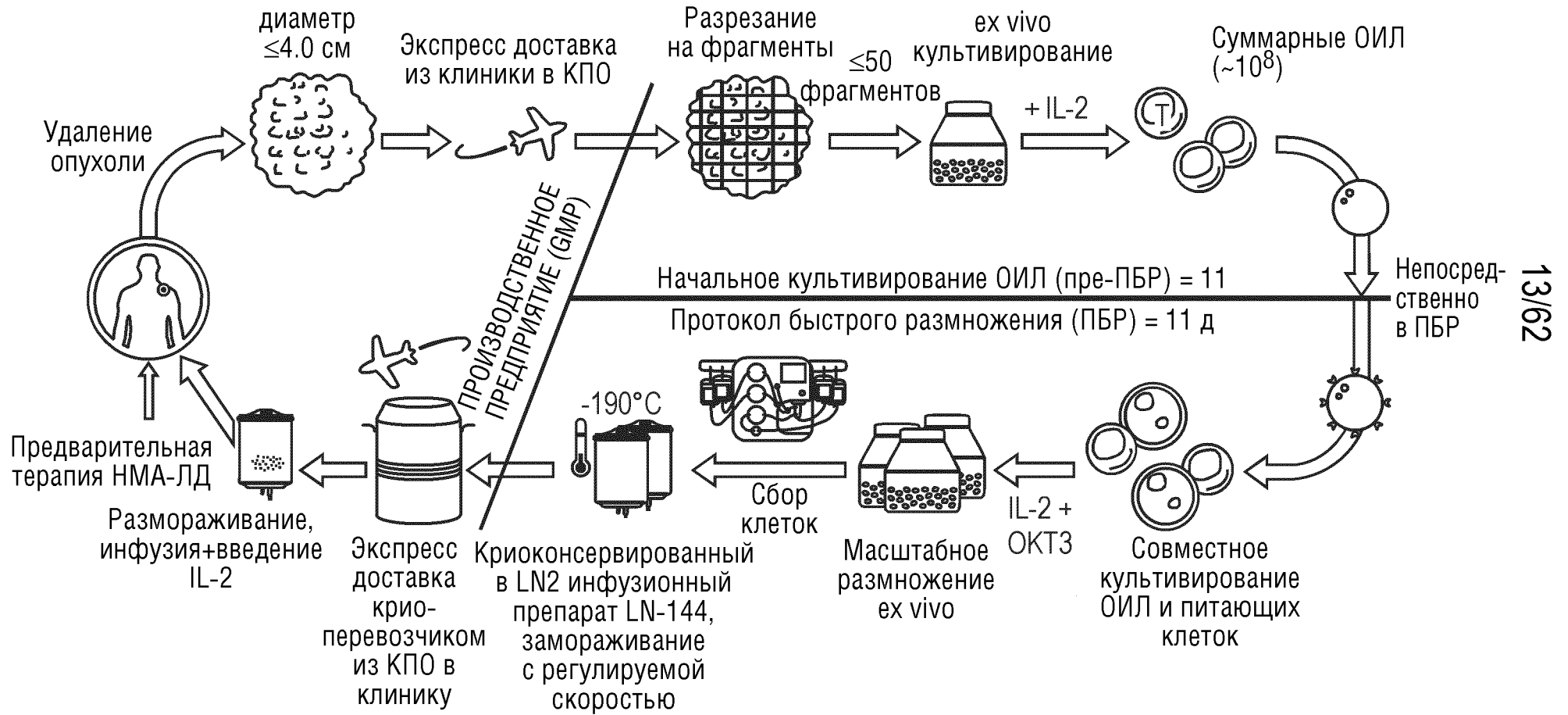
ФИГ.9



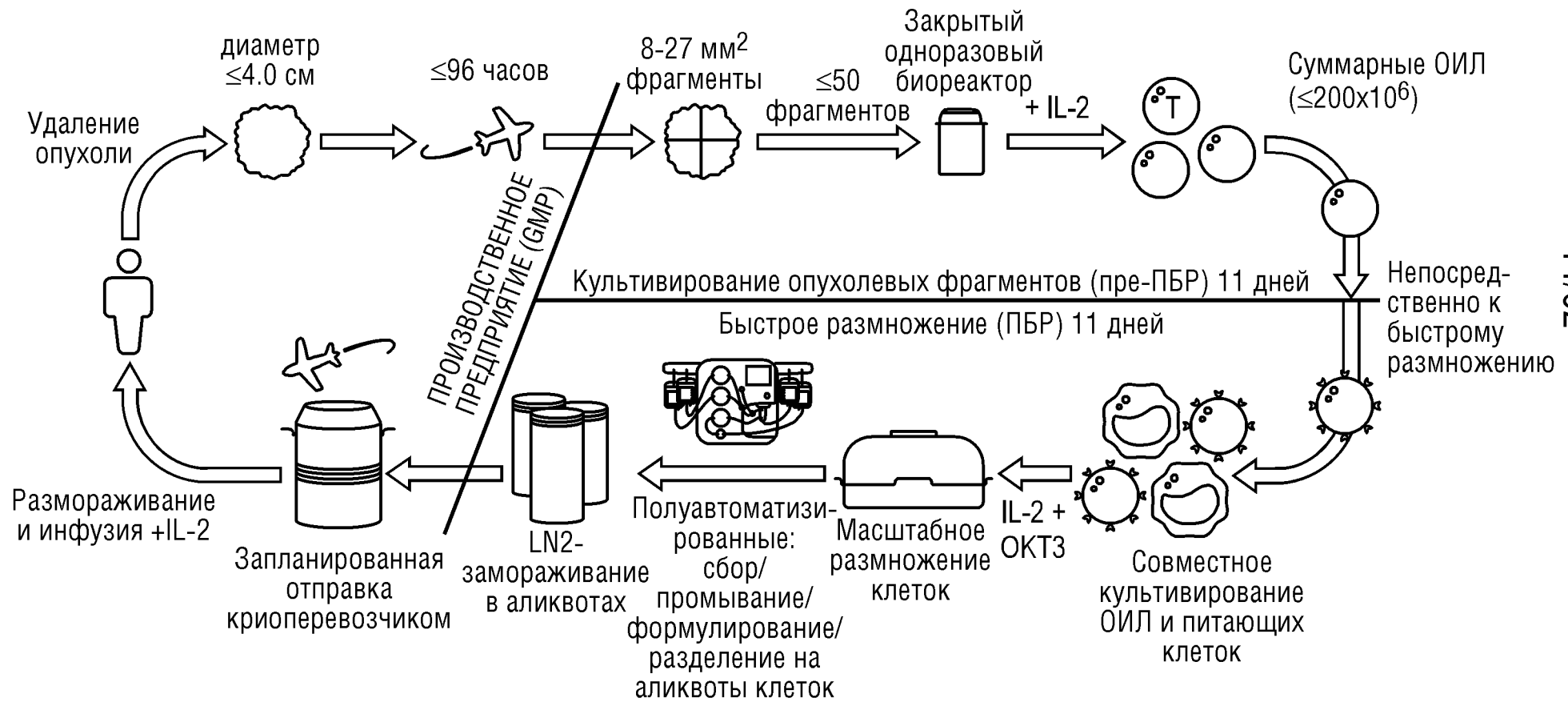
ФИГ.10



ФИГ.11



ФИГ.12



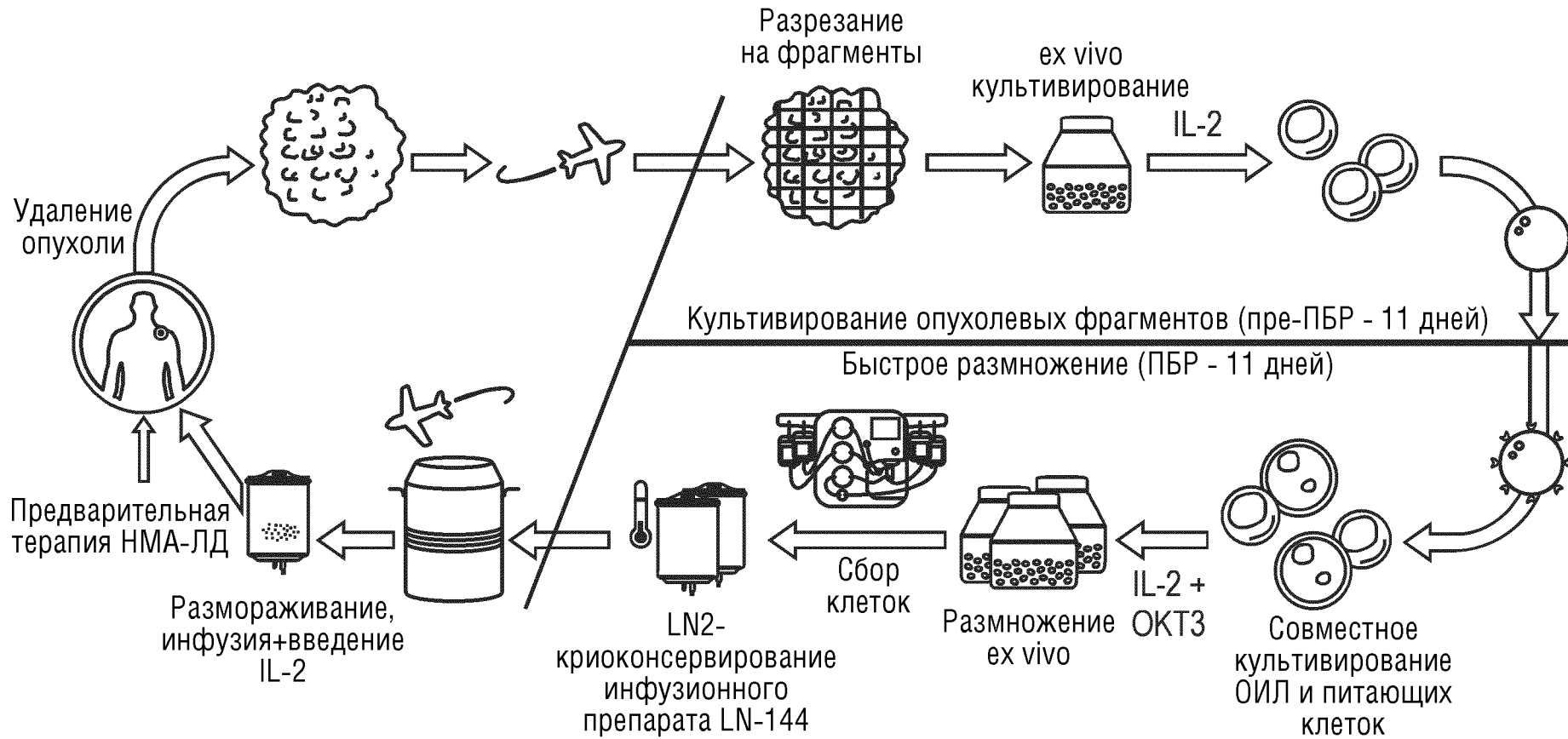
ФИГ.13

Способ 1С: 43-55 дней для этапов А - Е	Способ 2А: примерно 22 дня для этапов А - Е
<p>1. ЭТАП А Получение образца опухоли от пациента</p>	<p>1. ЭТАП А Получение образца опухоли от пациента</p>
<p>2. ЭТАП В Фрагментирование и первое размножение от 11 дней до 21 дня</p>	<p>2. ЭТАП В Фрагментирование и первое размножение от 3 дней до 14 дней</p>
<p>3. ЭТАП С Переход от первого размножения ко второму размножению Необязательно, хранение до отбора</p>	<p>3. ЭТАП С Переход от первого размножения ко второму размножению Отсутствие хранения и закрытая система</p>
<p>4. ЭТАП D Второе размножение IL-2, ОКТ-3, антигенпредставляющие питающие клетки Необязательно, повторение один или более раз</p>	<p>4. ЭТАП D Второе размножение IL-2, ОКТ-3 и антигенпредставляющие питающие клетки Закрытая система</p>
<p>5. ЭТАП Е Сбор ОИЛ из ЭТАПа D</p>	<p>5. ЭТАП Е Сбр ОИЛ из ЭТАПа D Закрытая система</p>
<p>6. ЭТАП F Окончательное формулирование и/или перенос в инфузионный мешок</p>	<p>6. ЭТАП F Окончательное формулирование и/или перенос в инфузионный мешок (необязательно, криоконсервирование)</p>

ФИГ. 14

Этап способа	Вариант осуществления способа 1С	Вариант осуществления способа 2А	Преимущества
Пре-ПБР	<ul style="list-style-type: none"> • 4 фрагмента на 10 флаконов G-REX 10 • Продолжительность 11-21 дней 	<ul style="list-style-type: none"> • 40 фрагментов на 1 флакон G-REX 100М • Продолжительность 11 дней 	<ul style="list-style-type: none"> • Увеличенное количество опухолевых фрагментов на флакон • Сокращенное время культивирования • Сокращенное количество этапов • Возможность использования с закрытой системой
Переход от пре-ПБР к ПБР	<ul style="list-style-type: none"> • Пре-ПБР ОИЛ замораживают до фенотипирования с целью отбора, затем размораживают для перехода к ПБР (~день 30) • Для ПБР необходимо $>40 \times 10^6$ ОИЛ 	<ul style="list-style-type: none"> • Пре-ПБР ОИЛ непосредственно переводят в ПБР в день 11 • Для ПБР необходимо $25-200 \times 10^6$ ОИЛ 	<ul style="list-style-type: none"> • Сокращенный процесс перехода от пре-ПБР к ПБР • Сокращенное количество этапов • Исключение фенотипирования для отбора • Возможность использования с закрытой системой
ПБР	<ul style="list-style-type: none"> • 6 флаконов G-REX 100М в день 0 ПБР • 5×10^6 ОИЛ и 5×10^8 питающих клеток МКПК на флакон в день 0 ПБР • Разделяют на 18-36 флаконов в день 7 ПБР • Продолжительность 14 дней 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 флакон G-REX 500М в день 11 • $25-200 \times 10^6$ ОИЛ и 5×10^9 питающих клеток МКПК в день 11 • Разделяют на ≤ 6 флаконов G-REX 500М в день 16 • Продолжительность 11 дней 	<ul style="list-style-type: none"> • Сокращенное количество этапов • Меньшая продолжительность ПБР • Перенос ОИЛ между флаконами в закрытой системе • Замена среды в закрытой системе
Сбор клеток	<ul style="list-style-type: none"> • ОИЛ собирают центрифугированием 	<ul style="list-style-type: none"> • ОИЛ собирают при помощи автоматизированной системы промывания клеток LOVO 	<ul style="list-style-type: none"> • Сокращенное количество этапов • Автоматизированное промывание клеток • Закрытая система • Уменьшение потерь препарата при промывании
Окончательное формулирование	<ul style="list-style-type: none"> • Свежий препарат в Hypothermosol • Один инфузионный мешок • Ограниченная стабильность при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Криоконсервированный препарат в PlasmaLyte-A+1% ЧСА и CS10, хранящийся в LN2 • Множество аликвот • Более длительная стабильность при транспортировке 	<ul style="list-style-type: none"> • Гибкие условия транспортировки • Гибкое расписание для пациента • Более своевременное тестирование выпускаемого препарата
Общее расчетное время процесса	<ul style="list-style-type: none"> • 43-55 дней 	<ul style="list-style-type: none"> • 22 дня 	<ul style="list-style-type: none"> • Более короткие сроки лечения для пациента

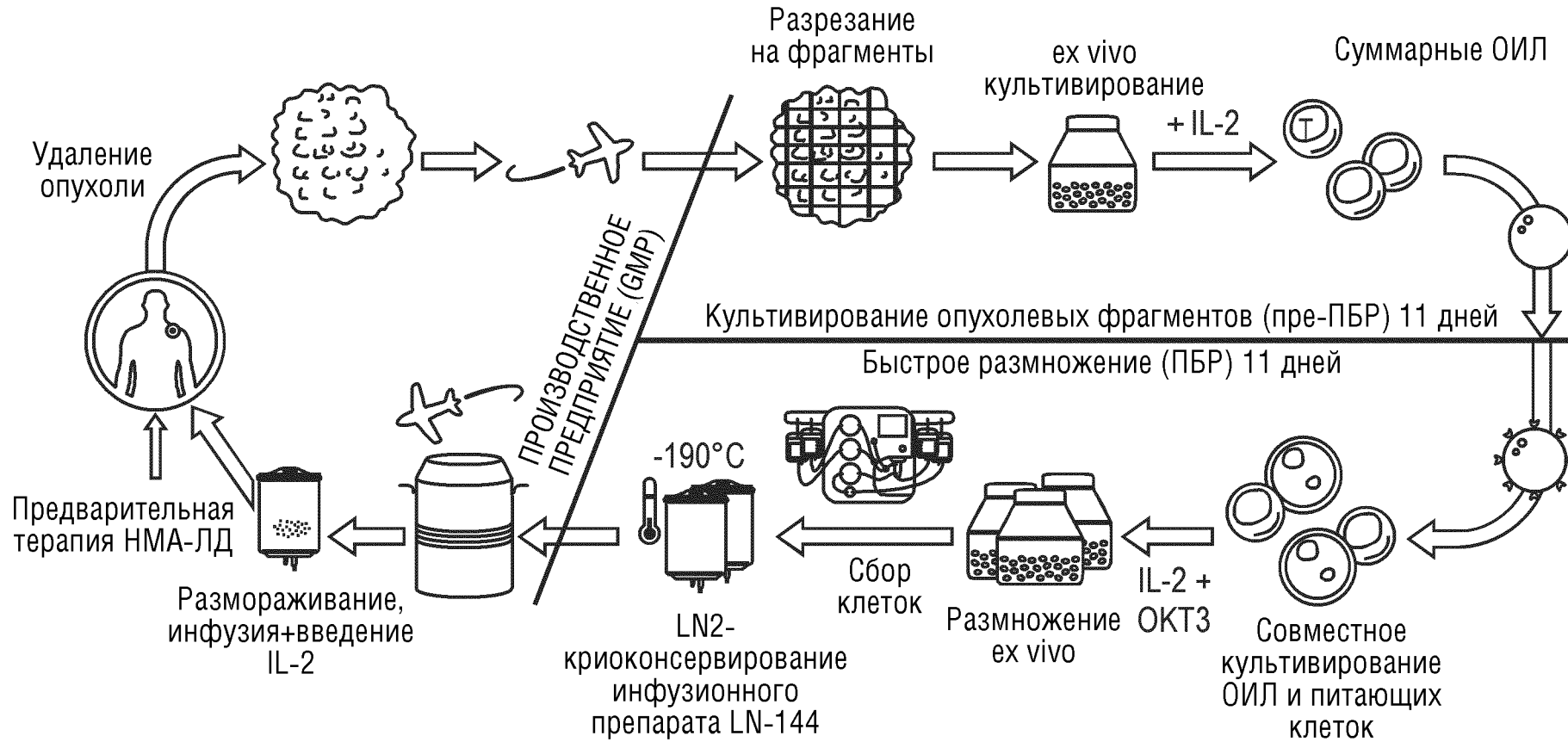
ФИГ.15



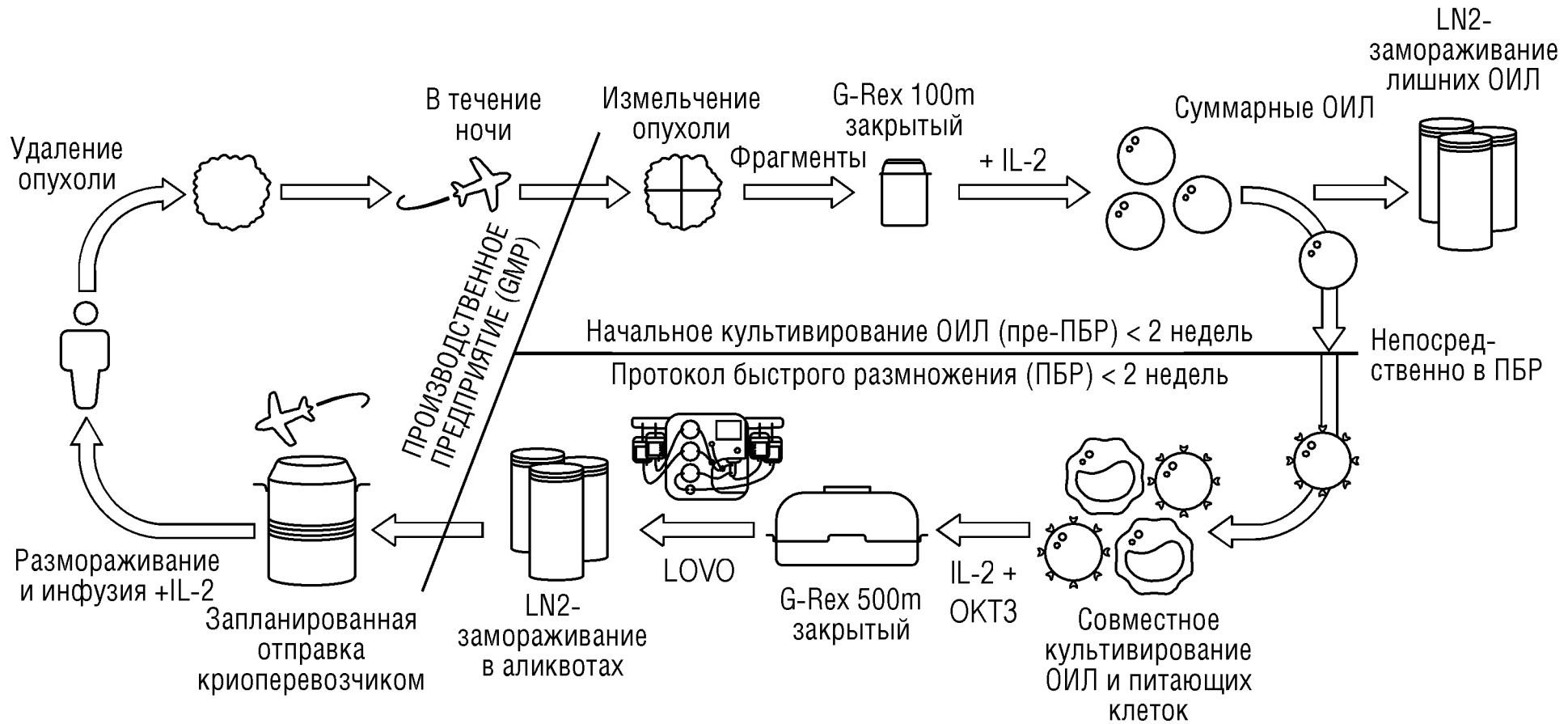
ФИГ.16

Этап способа	GEN 1	GEN 2	Изменение
Культивирование фрагментов	≤21 дней, несколько биореакторов, неоднократные вмешательства оператора	≤11 дней, один закрытый биореактор, без вмешательства оператора	Сокращение срока культивирования, уменьшение вмешательств
Отбор ОИЛ	Размноженные при помощи IL-2 ОИЛ криоконсервируют, тестируют, отбирают на основании фенотипа, размораживают, оставляют покоиться, совместно культивируют	Суммарные ОИЛ непосредственно в процесс совместного культивирования	Сокращение количества этапов, устранение тестирования, возрастание клонального разнообразия
Сбор/промывание клеток	Ручное уменьшение объема и сбор клеток. Ручное промывание и концентрирование.	Закрытое полу-автоматизированное уменьшение объема и сбор клеток. Автоматизированное промывание и концентрирование.	Уменьшение вмешательств оператора, уменьшение продолжительности процесса, сохранение функционально закрытой системы
Формулирование	Свежий охлажденный препарат (2-8°C)	Криоконсервированный препарат (≤-150°C)	Возможность испытаний в мировом масштабе за счет большей гибкости условий транспортировки и расписания лечения пациента
Время, затраченное на производство	38-дневный процесс	22-дневный процесс	Срок лечения пациента, увеличение пропускной способности чистых помещений, более низкая стоимость препарата

ФИГ.17

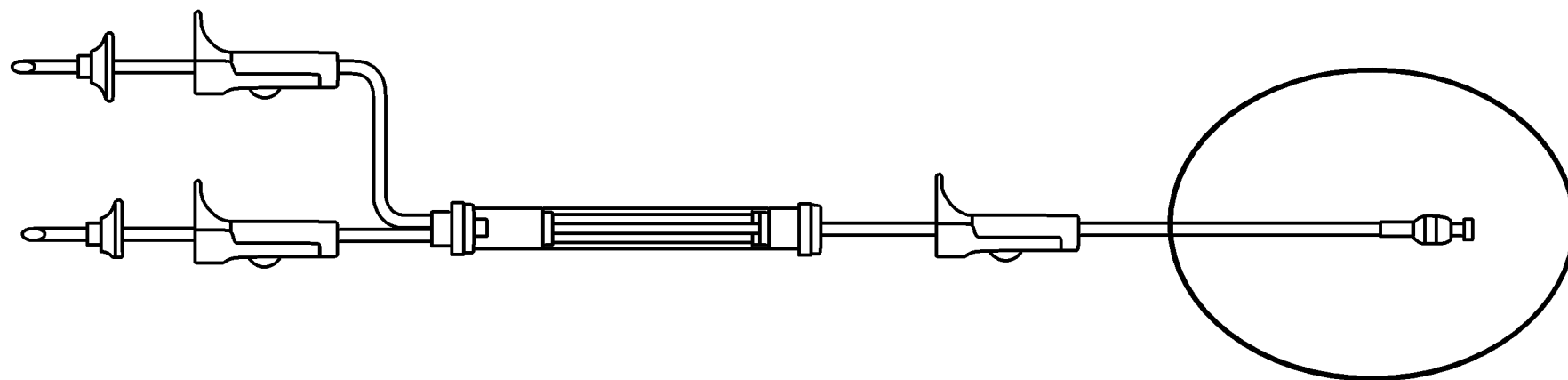


ФИГ.18



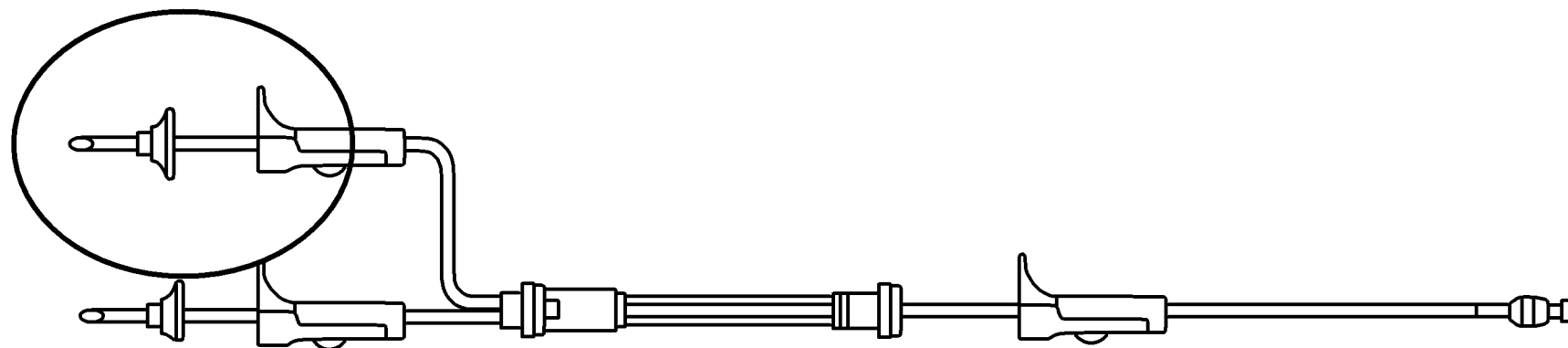
20162

ФИГ.19

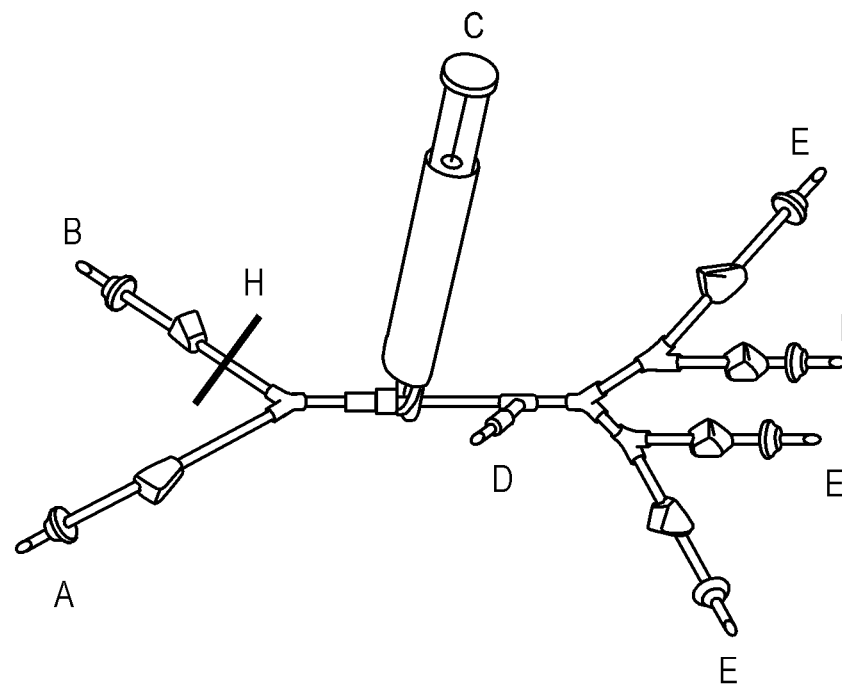
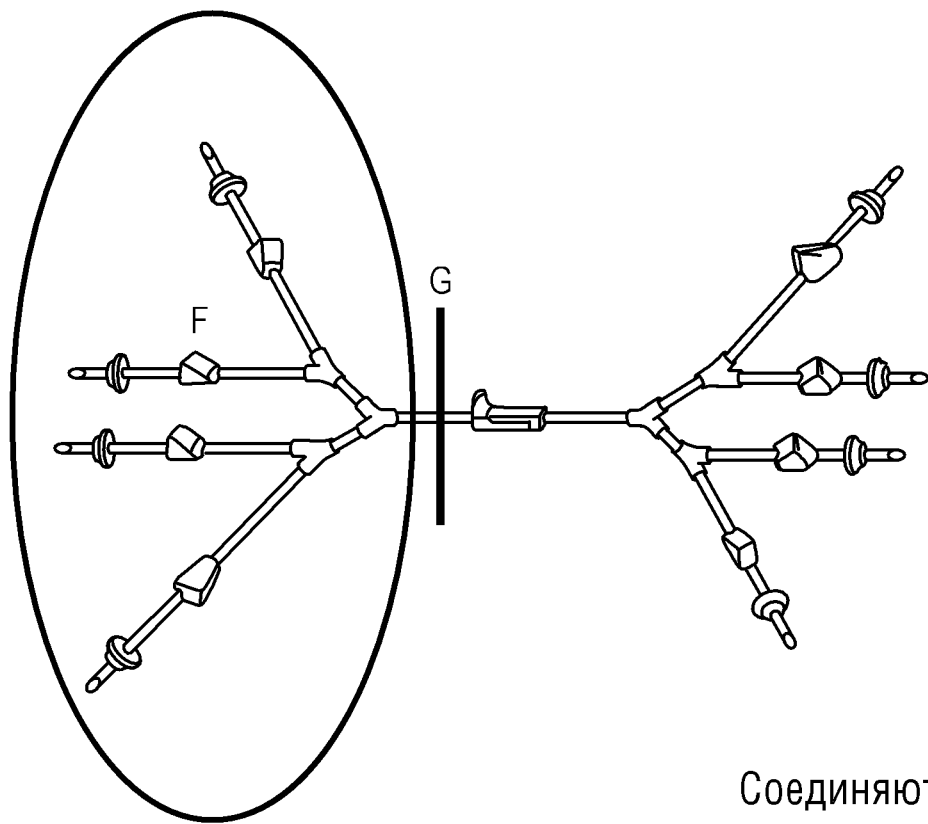


21/62

ФИГ.20

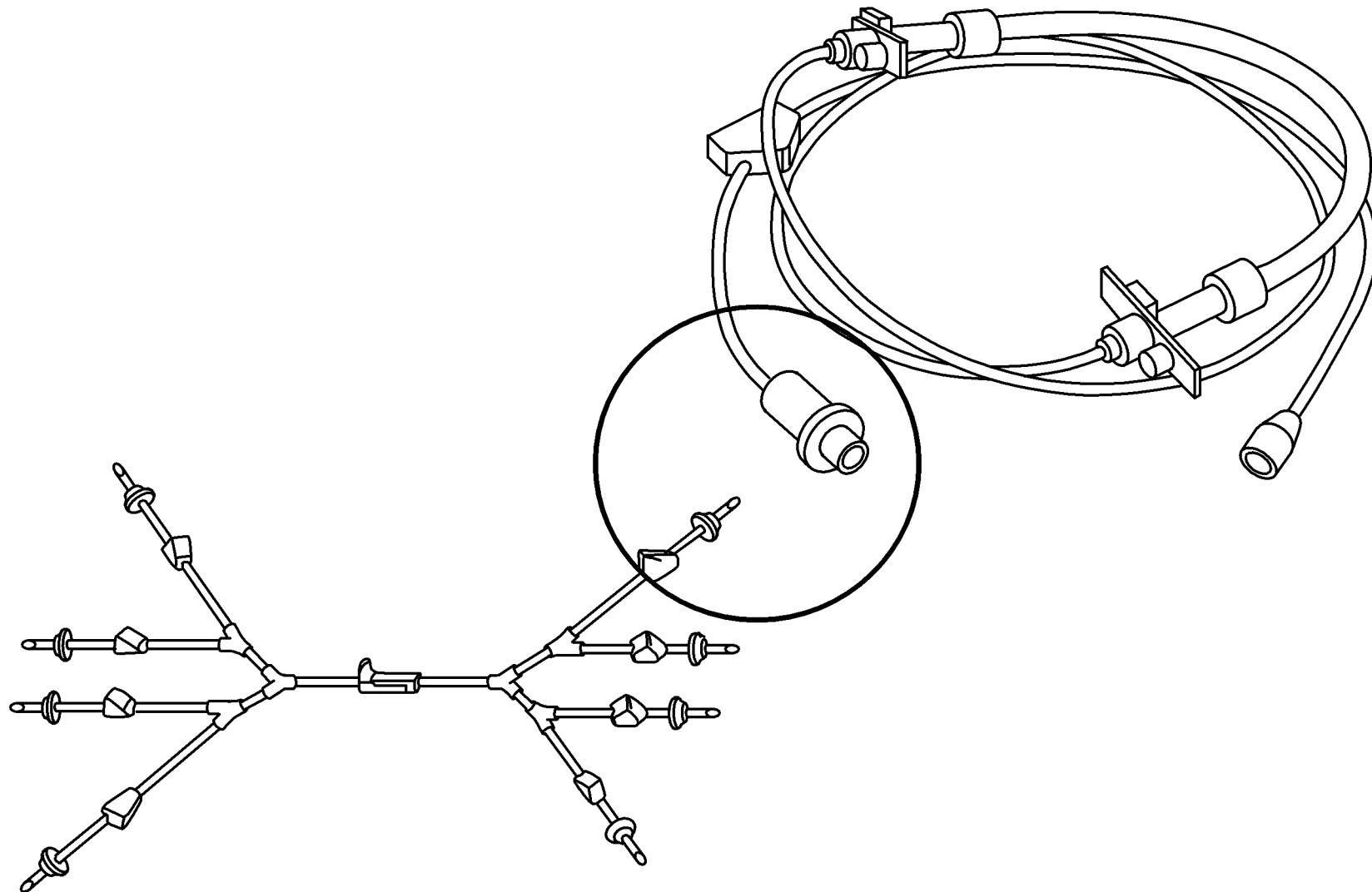


ФИГ.21



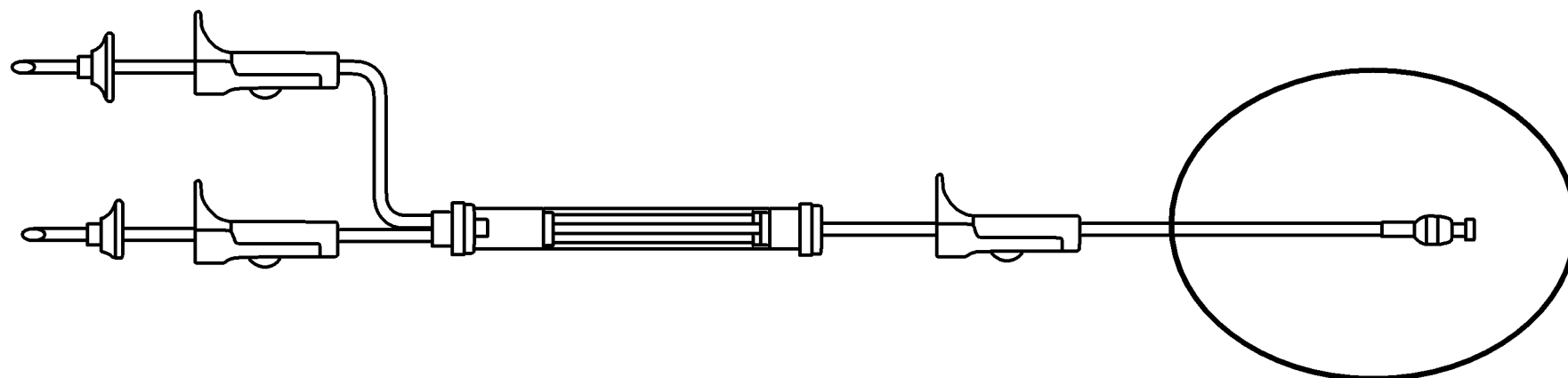
Соединяют сваркой Н с G

ФИГ.22



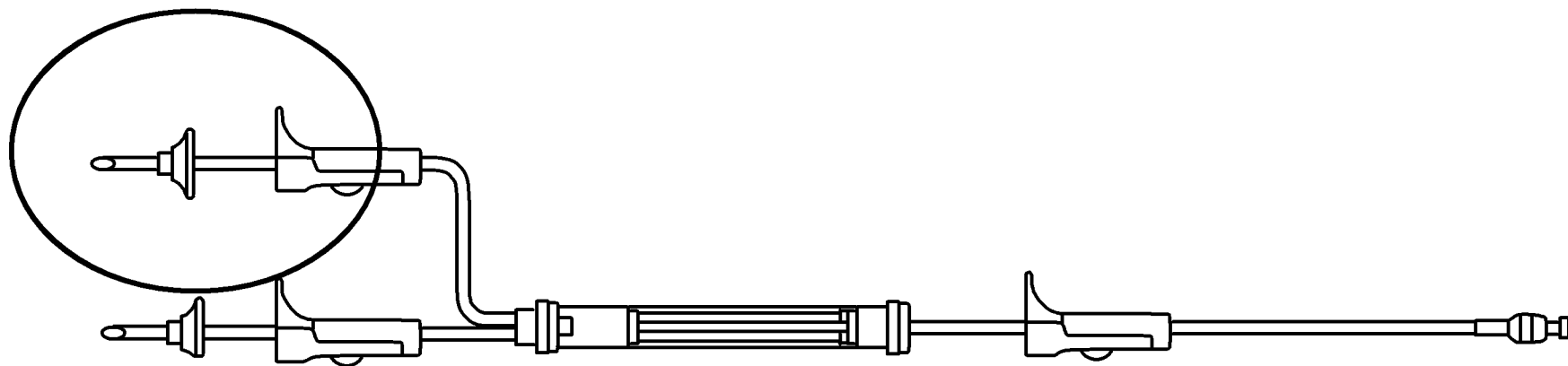
24/62

ФИГ.23

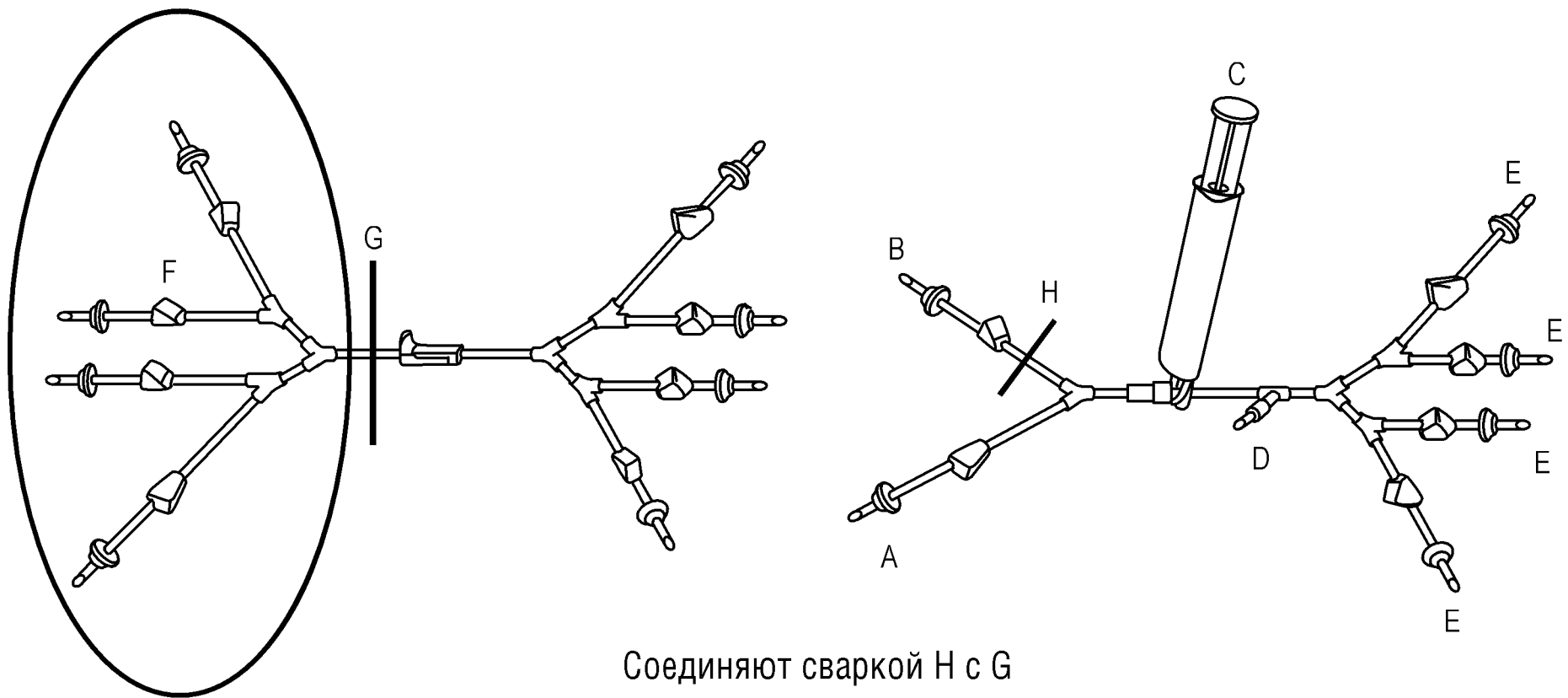


25/62

ФИГ.24

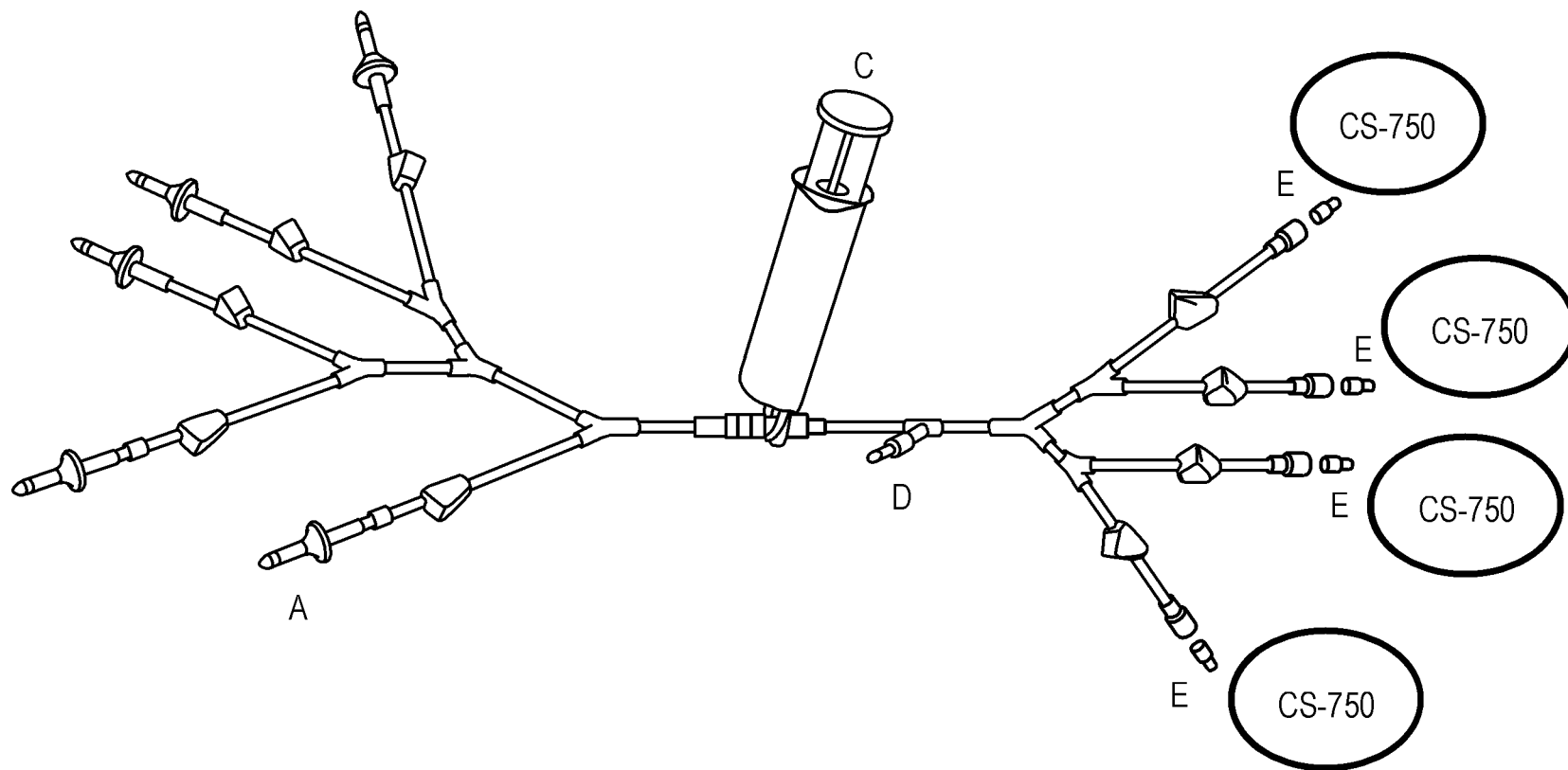


ФИГ.25

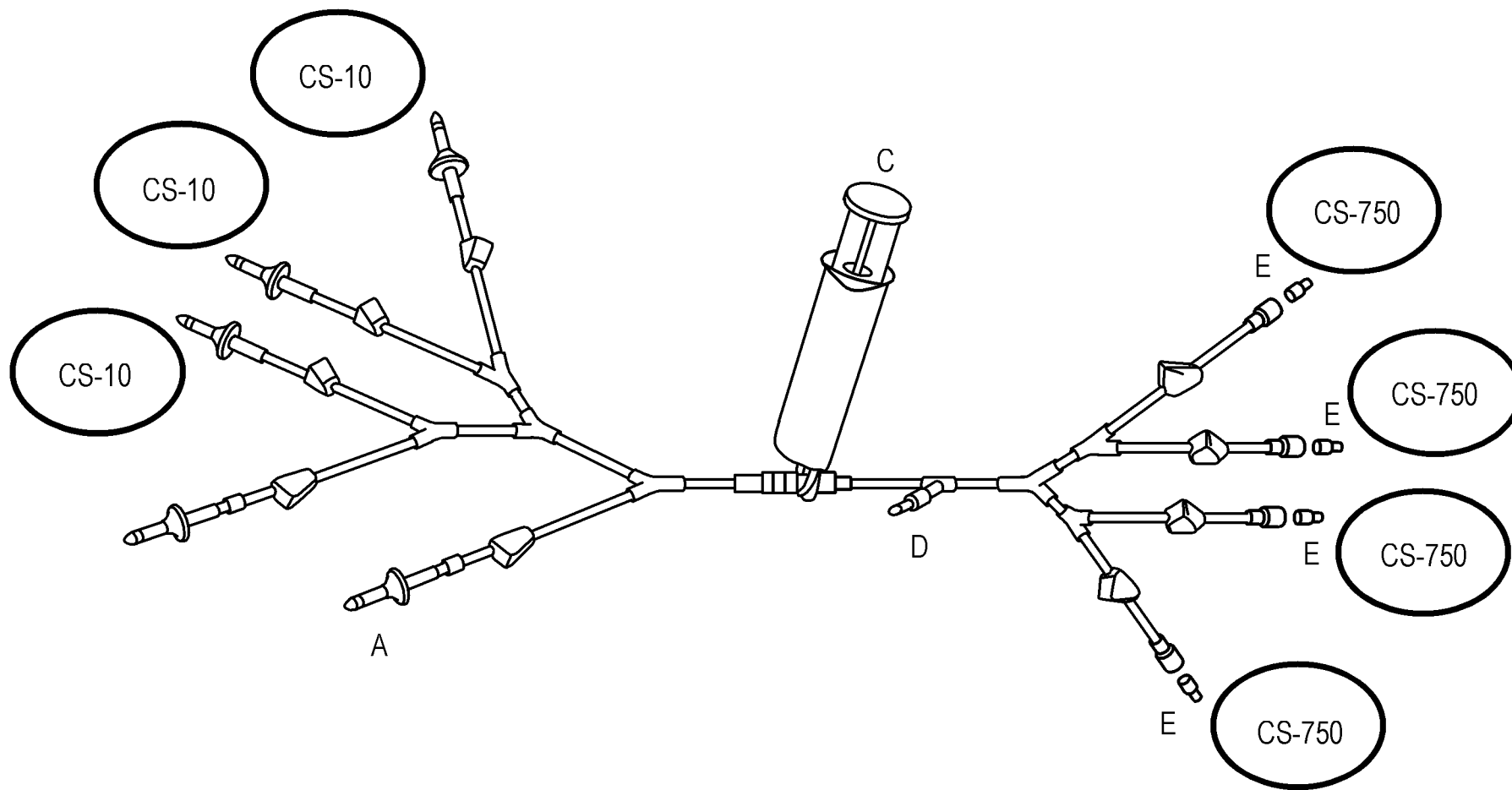


27/62

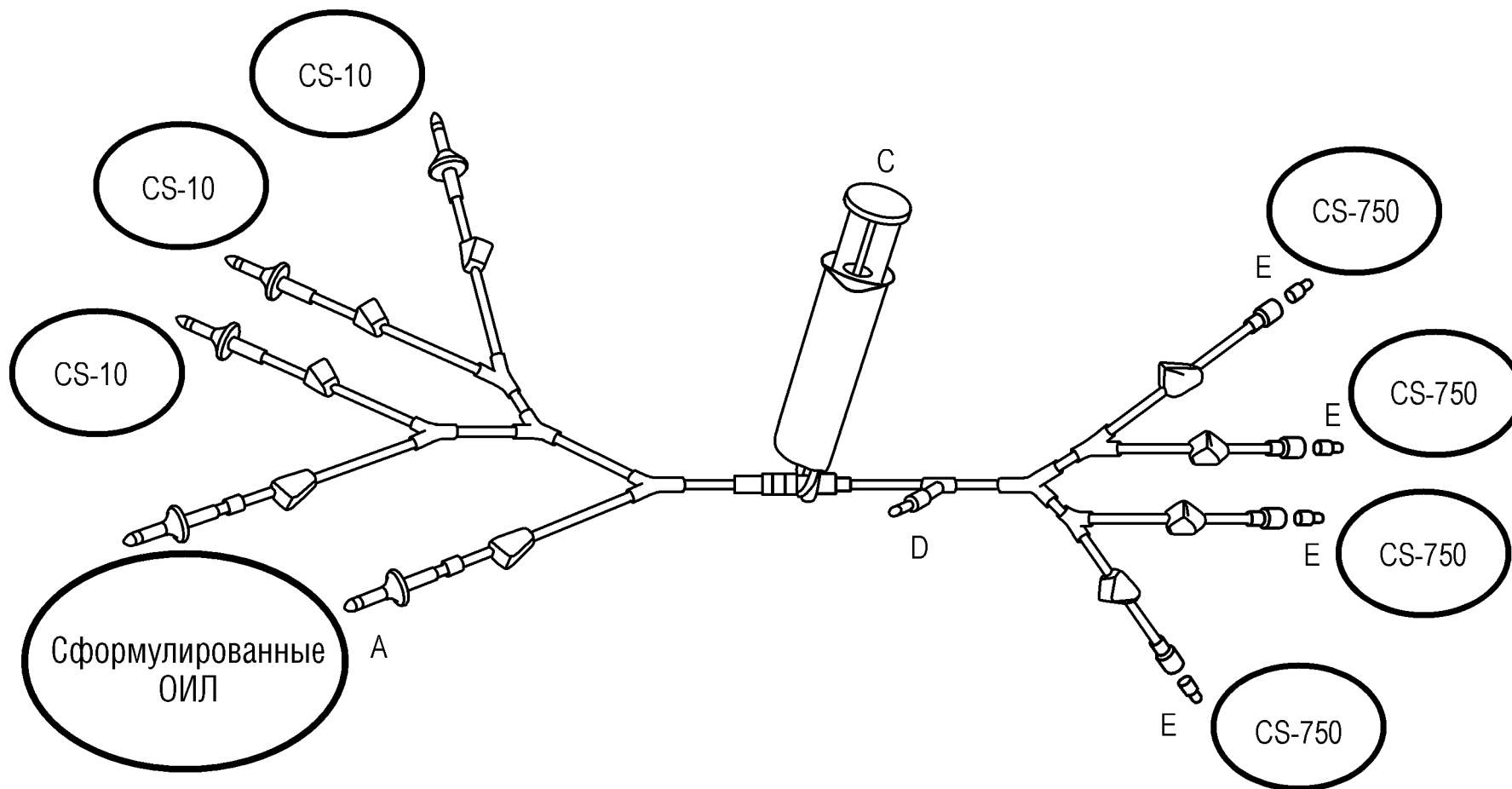
ФИГ.26



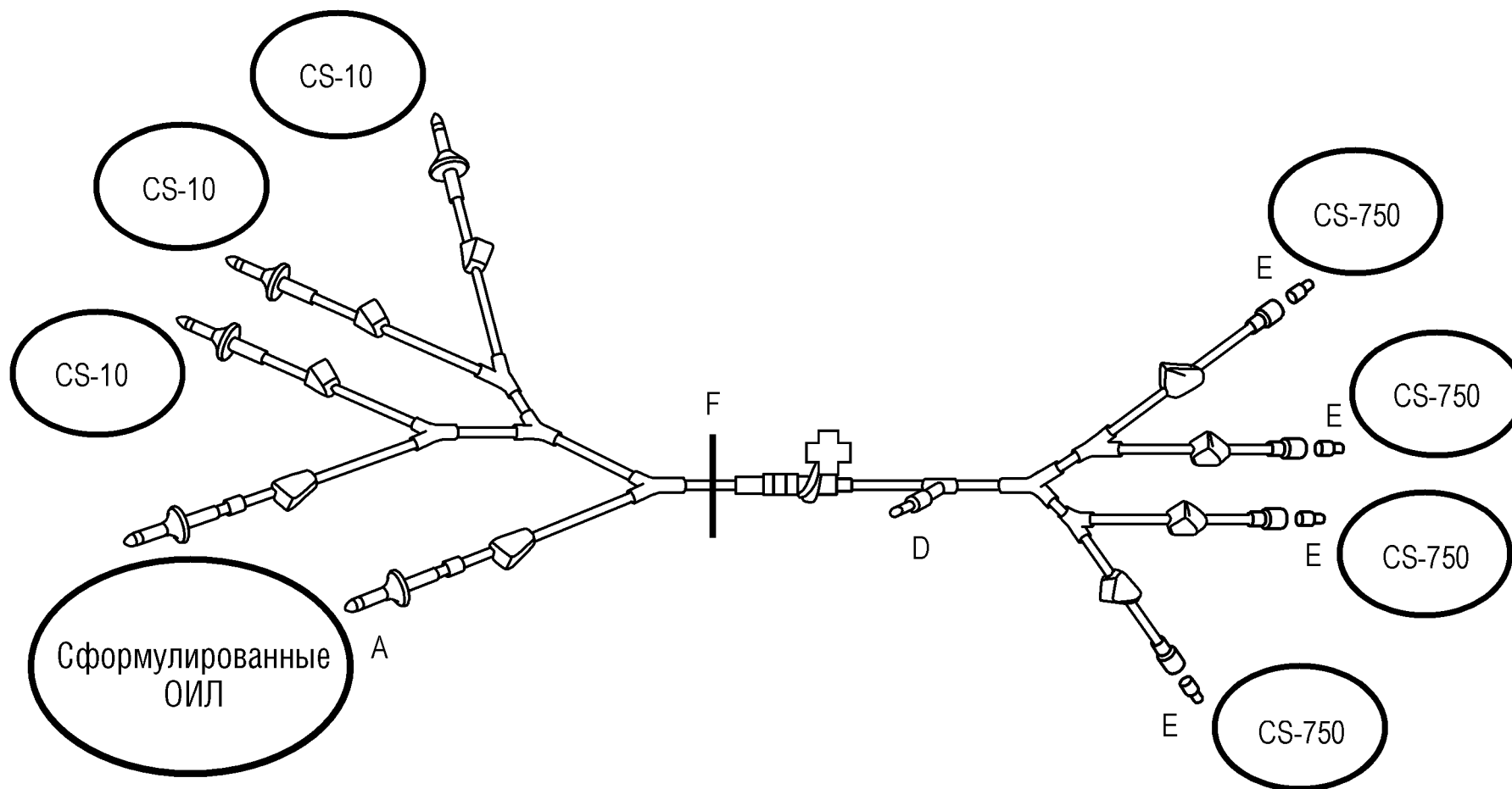
ФИГ.27



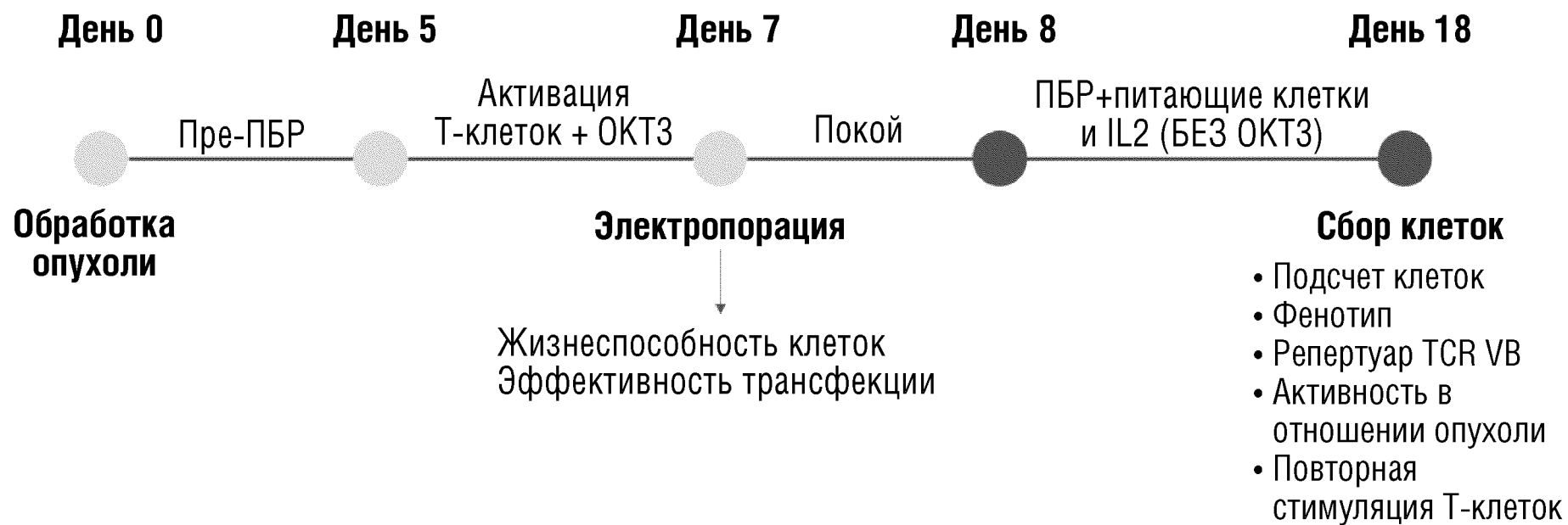
ФИГ.28



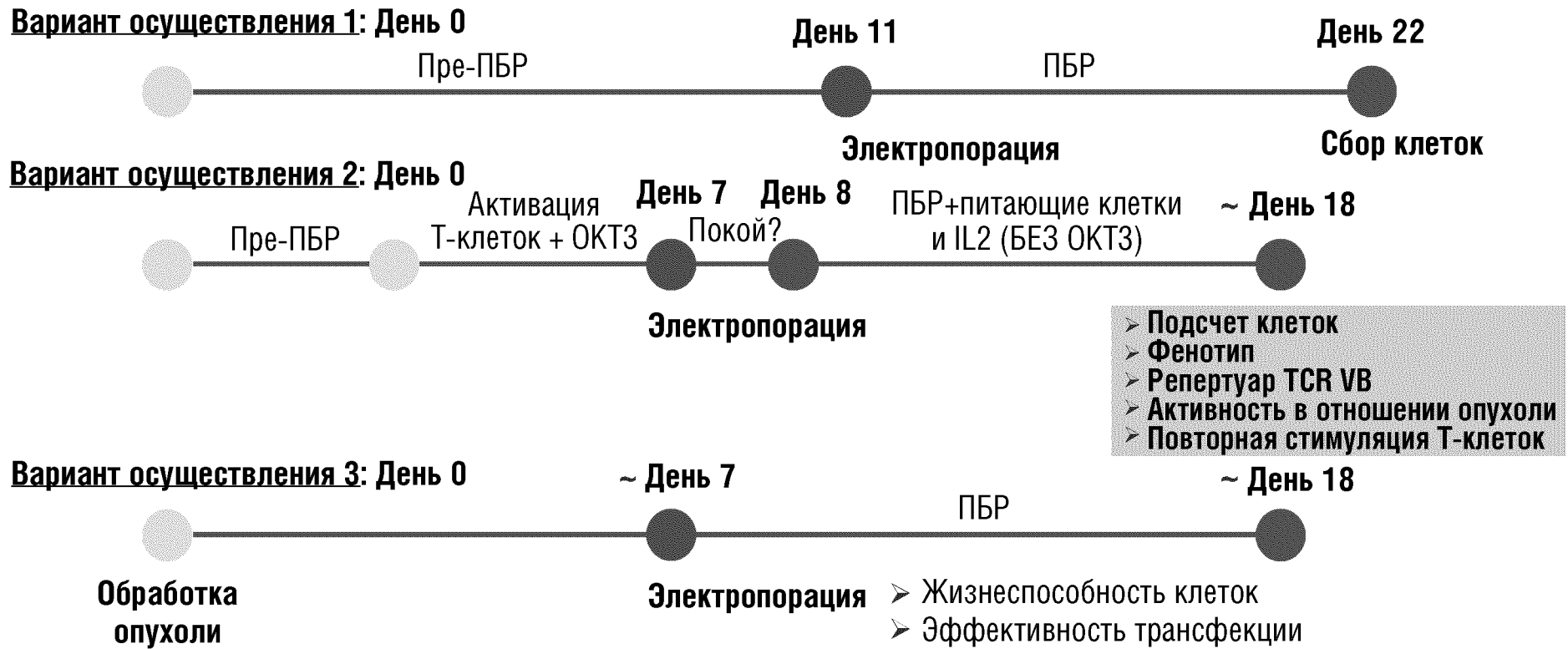
ФИГ.29



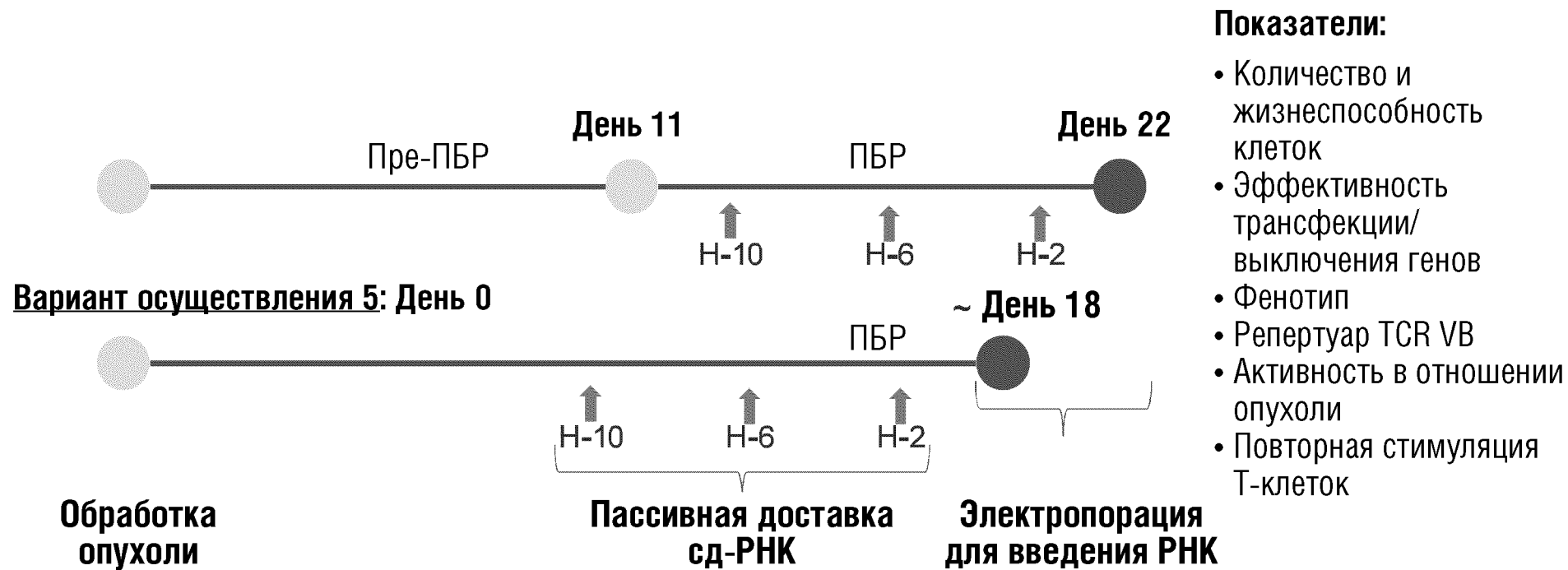
ФИГ.30



ФИГ.31



ФИГ.32



ФИГ.33

	KO	KD	KI	TR	TA
Нацеливание на опухоль (направл. миграция)			CXCR1/2 CD44 CCR4/5		CXCR1/2 CD44 CCR4/5
Эффекторная функция/TCR сигнализация	PD1 CISH VHL CBL-B TGFBR PKA LAG3 TIM3	PD1 CISH VHL CBL-B TGFBR PKA LAG3 TIM3	CCR IL2, 12 или 15 (локус PD1)	PD1 <i>CISH (индуцируем.)</i> VHL CBL-B TGFBR PKA LAG3 TIM3	
Персистенция	PIK3CD SOCS1	PIK3CD SOCS1	NOTCH1/2 ICD BCL2L1	PIK3CD SOCS1	
Нацеливание на опухоль (специфичность)			Неоантиген-специфические TCR		

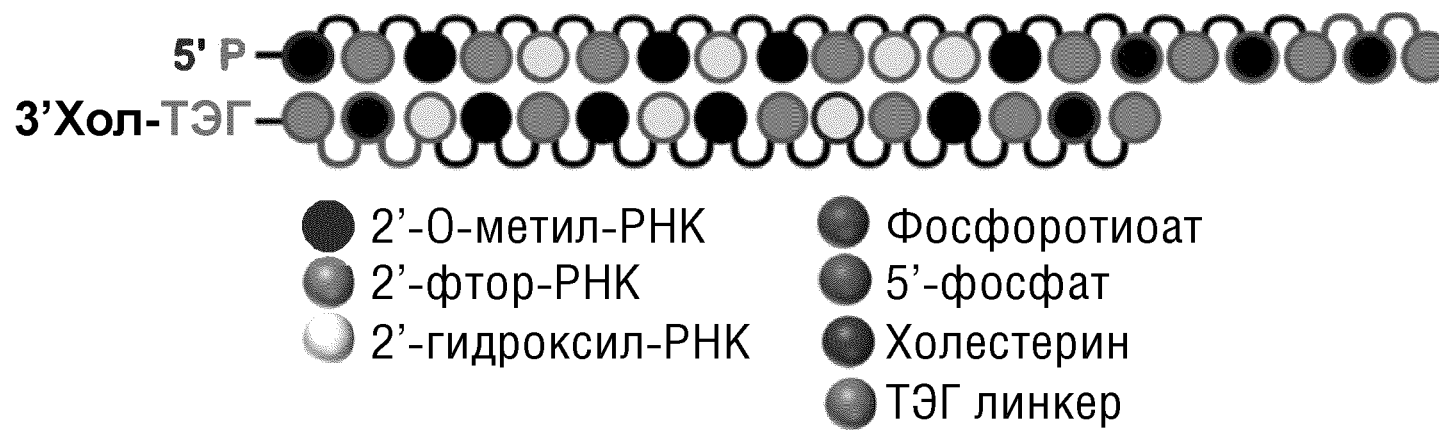
ФИГ.34

Хемокин	Хемокиновый рецептор
CCL2 (MCP-1)	CCR4/CCR2
CCL3 (MIP-1 α)	CCR4
CCL4 (MIP-1 β)	CCR5
CCL5 (RANTES)	CCR5
CXCL1/CXCL8	CXCR2*
CXCL9 (MIG)	CXCR3
CXCL10 (IP-10)	CXCR3

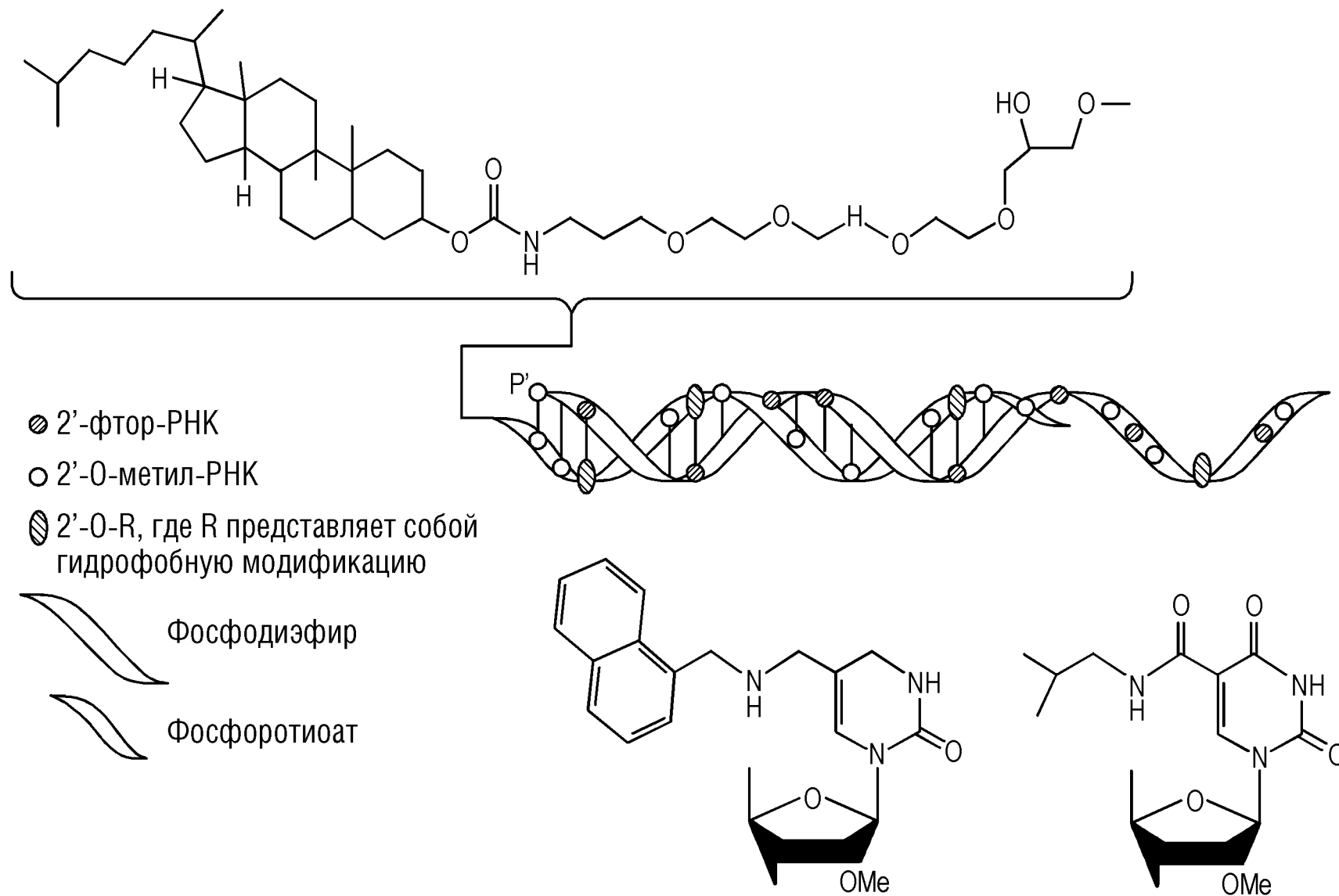
ФИГ.35

Избыточно экспрессированные хемокины	Избыточно экспрессированные хемокиновые рецепторы
CCL2 (MCP-1) CCL3 (MIP-1 α) CCL4 (MIP1- β) CCL5 (RANTES) CXCL1/CXCL8	<ul style="list-style-type: none"> • Т-клетки здорового донора активировали для избыточной экспрессии CCR1, CCR2, CCR5, CCR7, CXCR3, CXCR4. • CXCR3+, CCR5+ Т-клетки продемонстрировали самый высокий рекрутинг в анализах Transwell
CCL22	CCR4 (цитотоксические Т-клетки, модифицированные для экспрессии CCR4, продемонстрировали повышенное приживание в опухоли и уничтожение опухоли)
CCL17	CCR4 (CD30+ CAR Т-клетки, модифицированные для экспрессии CCR4, продемонстрировали улучшенную миграцию и повышенную противоопухолевую активность)
CXCL1/CXCL8	CXCR2 (Полученные из МКПК Т-клетки, модифицированные для экспрессии CXCR2, продемонстрировали улучшенную миграцию и повышенное продуцирование IFN- γ)

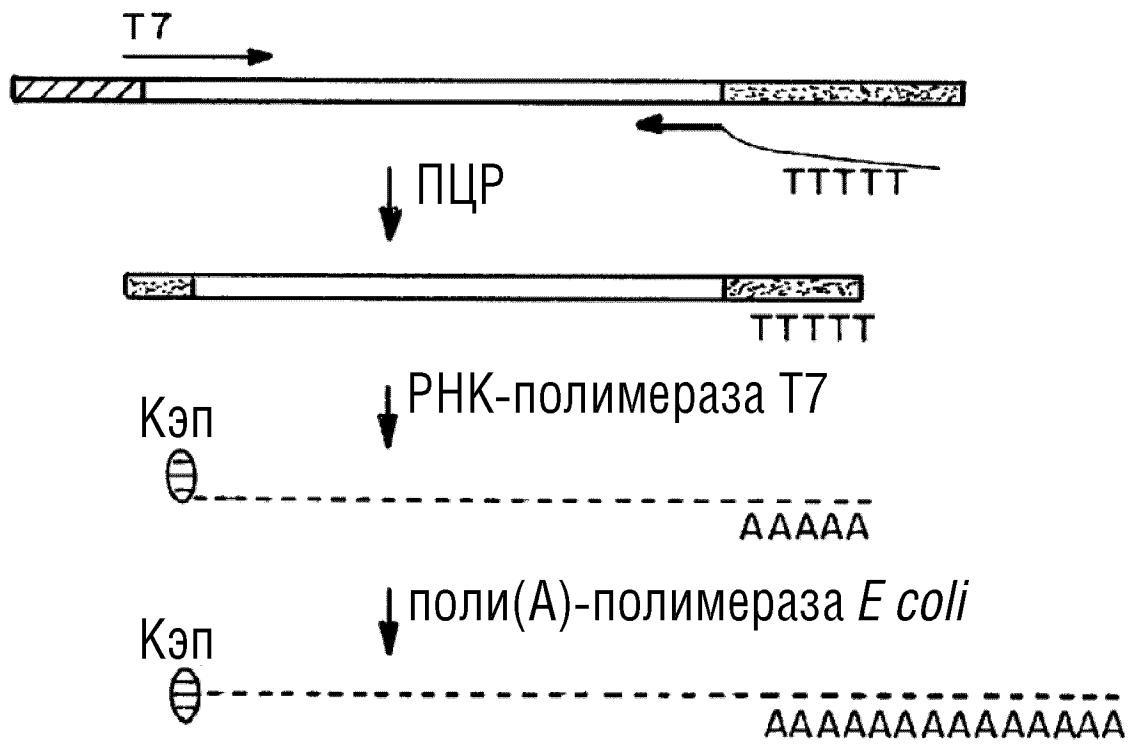
ФИГ.36



ФИГ.37



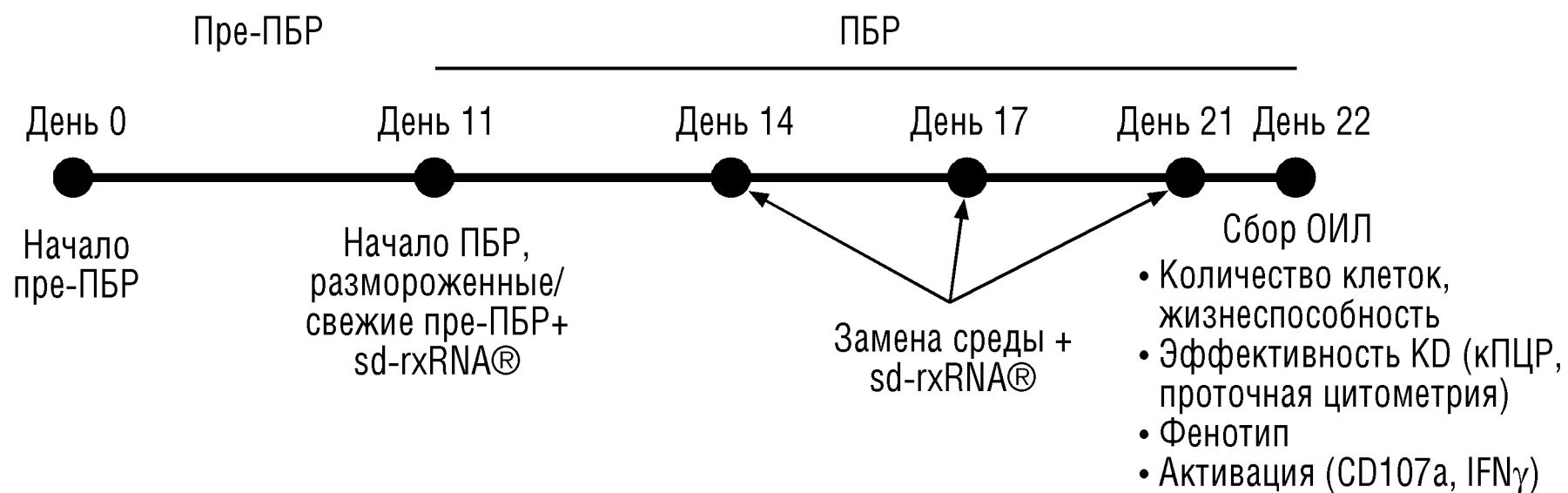
ФИГ.38



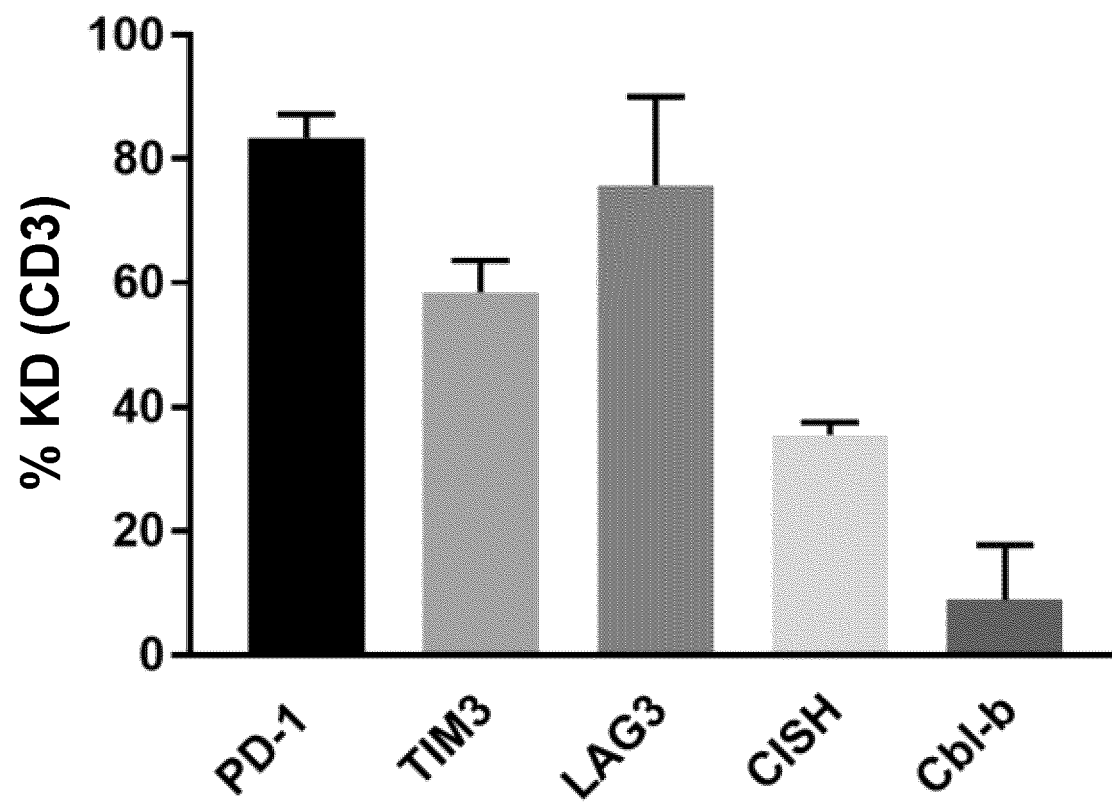
ФИГ.39

Ген-мишень	Последовательность sd-rxRNA®	Реагент Rxi	Метод определения КД
PDCD1	Не предоставлена	Предоставлен	Проточная цитометрия
TIM3 (HAVCR1)	Не предоставлена	Предоставлен	Проточная цитометрия
CBLB	Не предоставлена	Предоставлен	кПЦР, проточная цитометрия, вестерн-блоттинг
LAG3	Не предоставлена	Предоставлен	Проточная цитометрия
CISH	Не предоставлена	Предоставлен	кПЦР, проточная цитометрия, вестерн-блоттинг

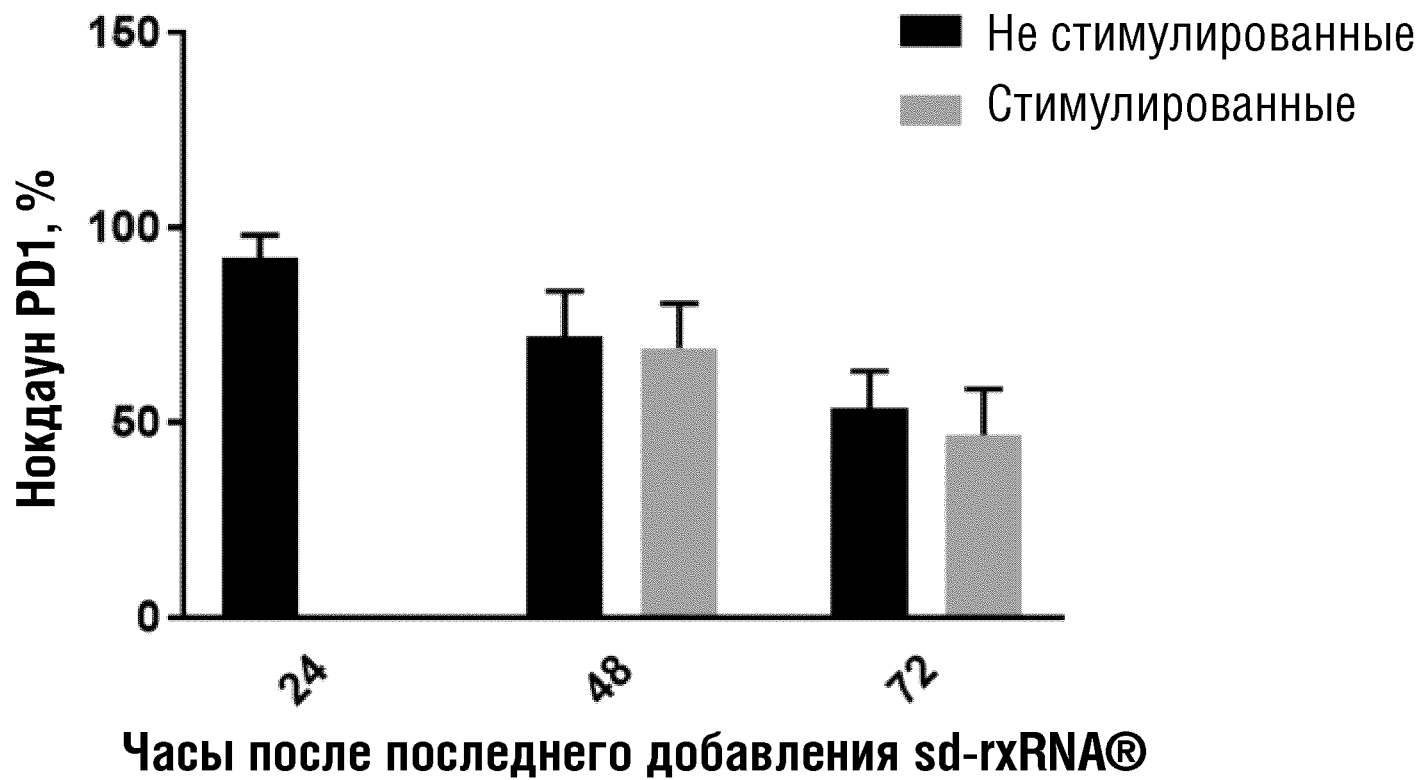
ФИГ.40



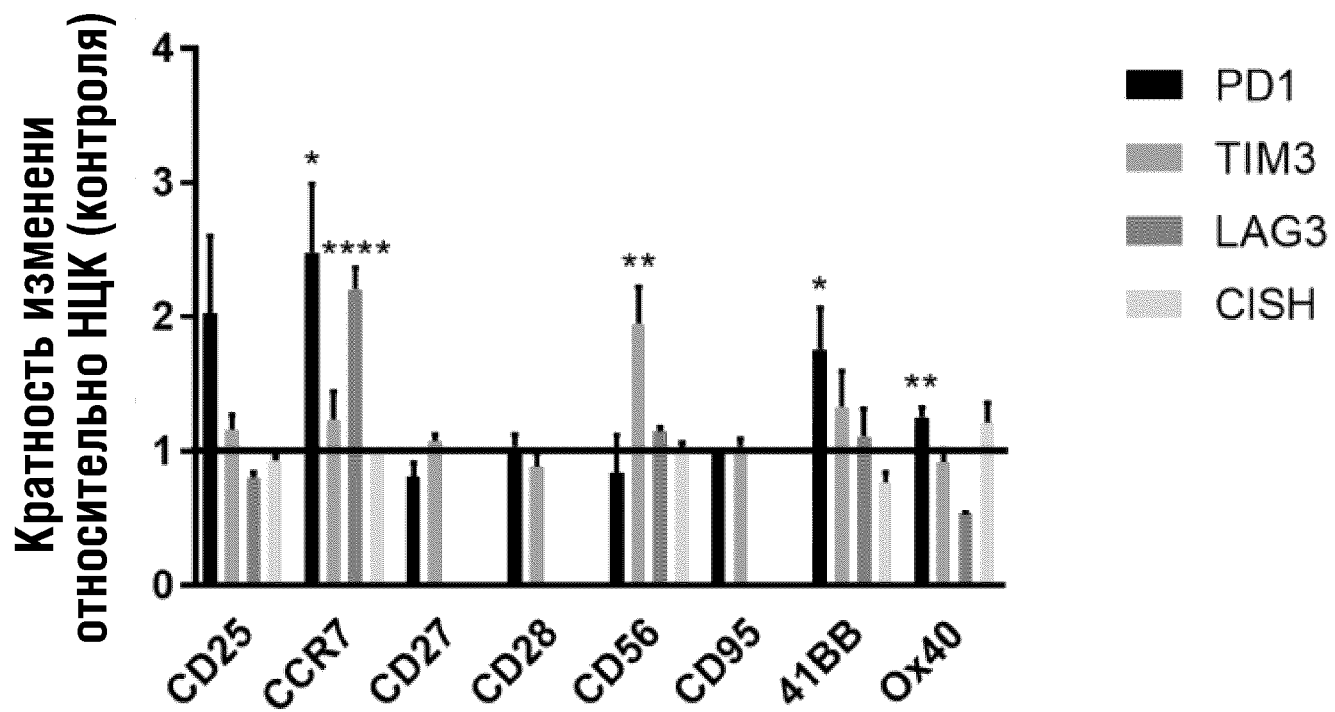
ФИГ.41



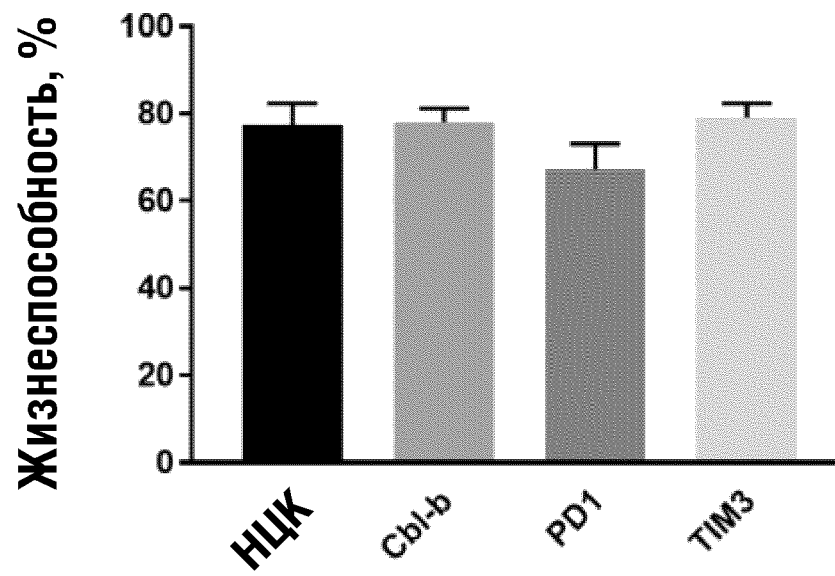
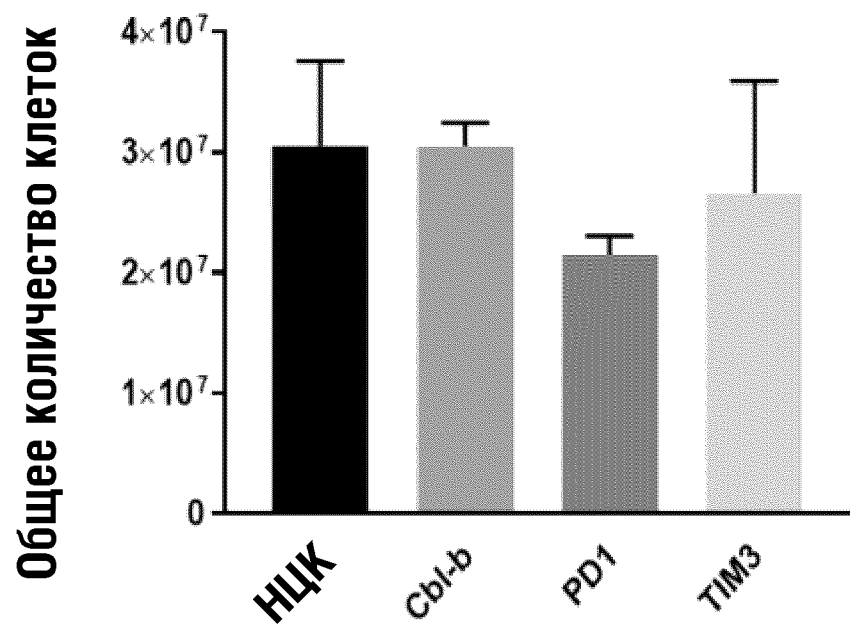
ФИГ.42



ФИГ.43

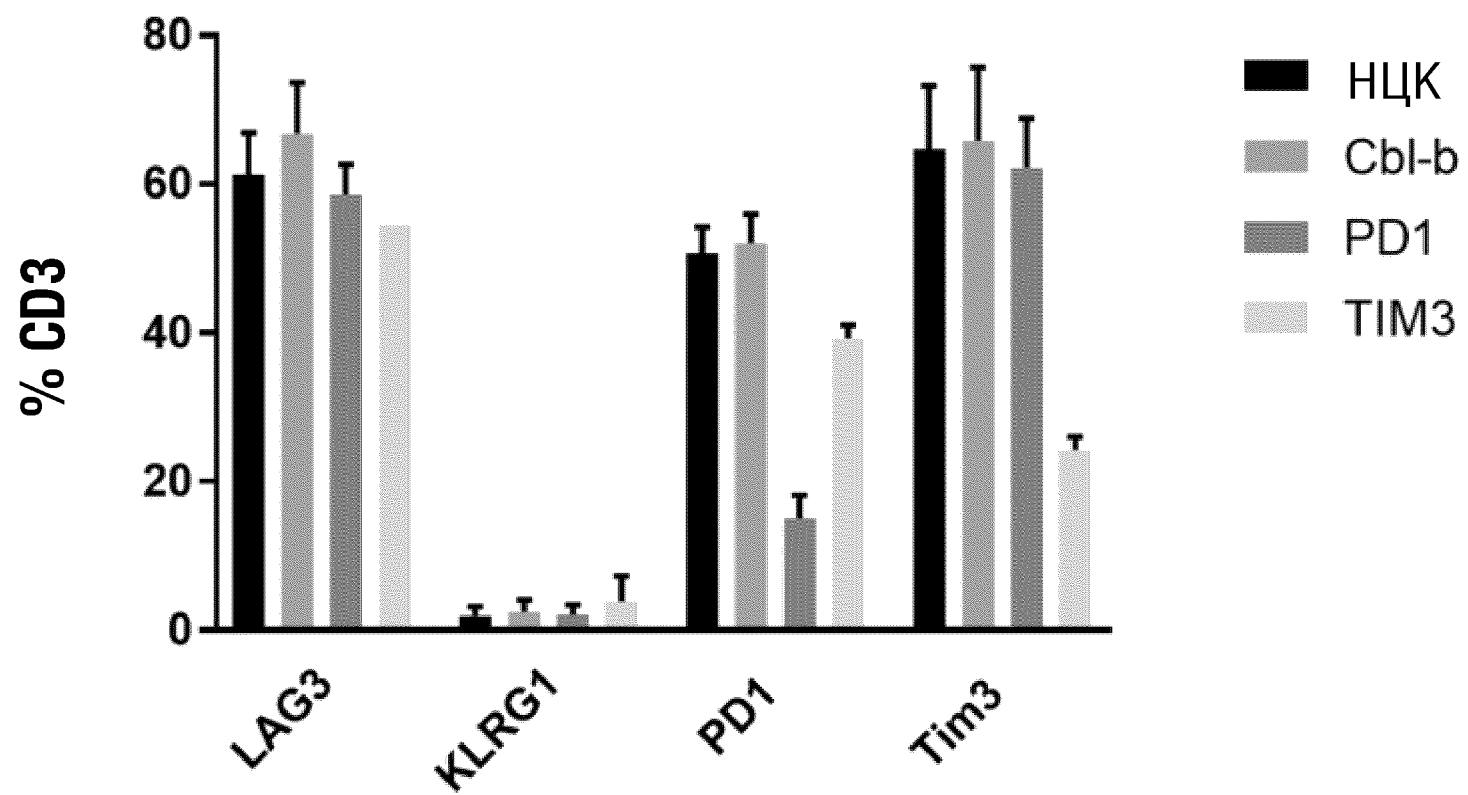


ФИГ.44

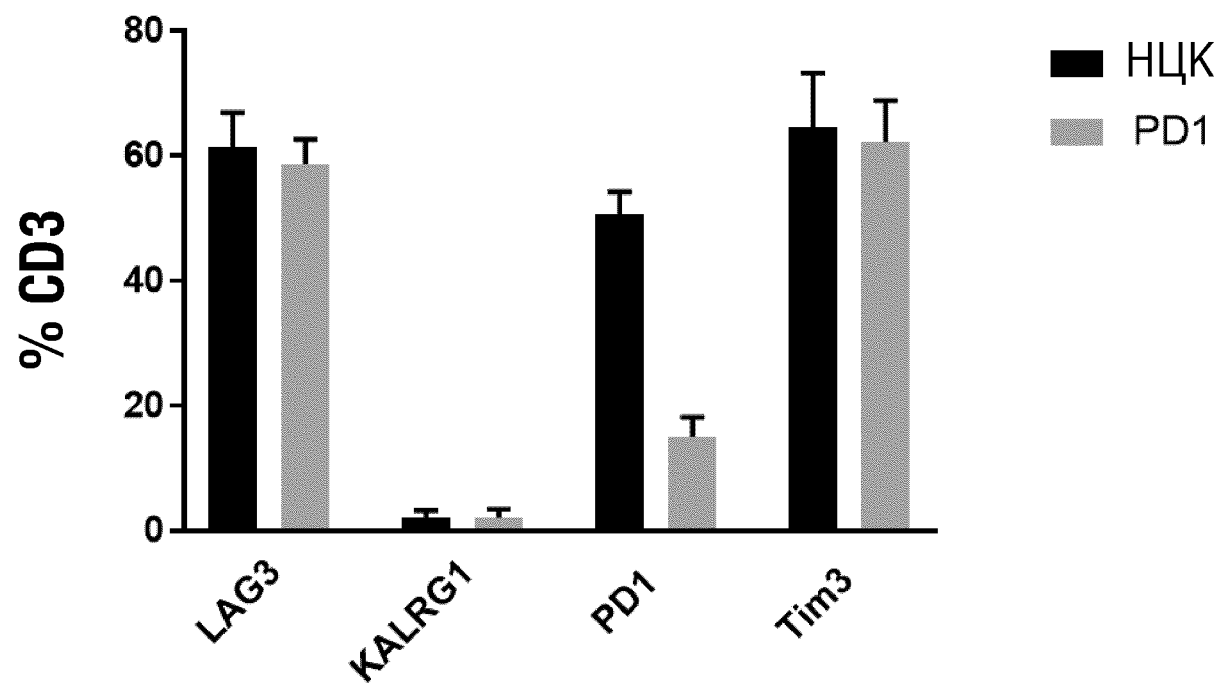


46/62

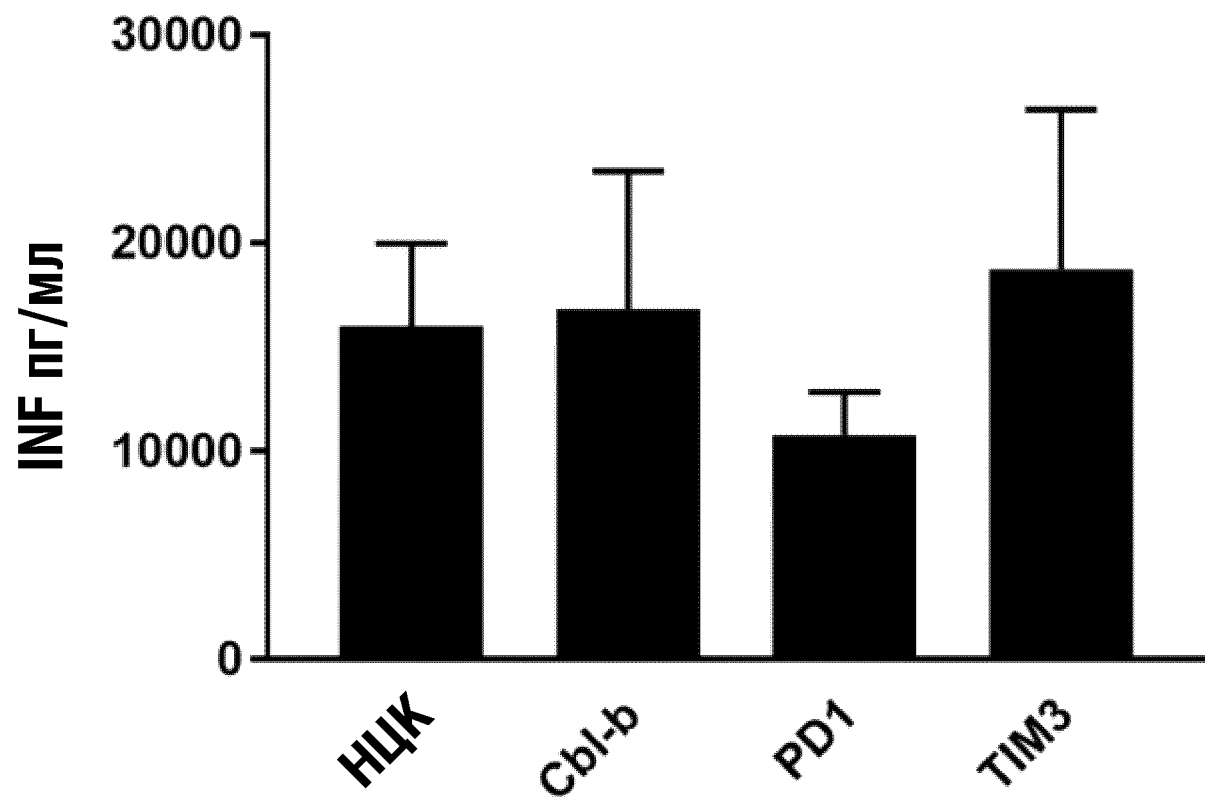
ФИГ.45А



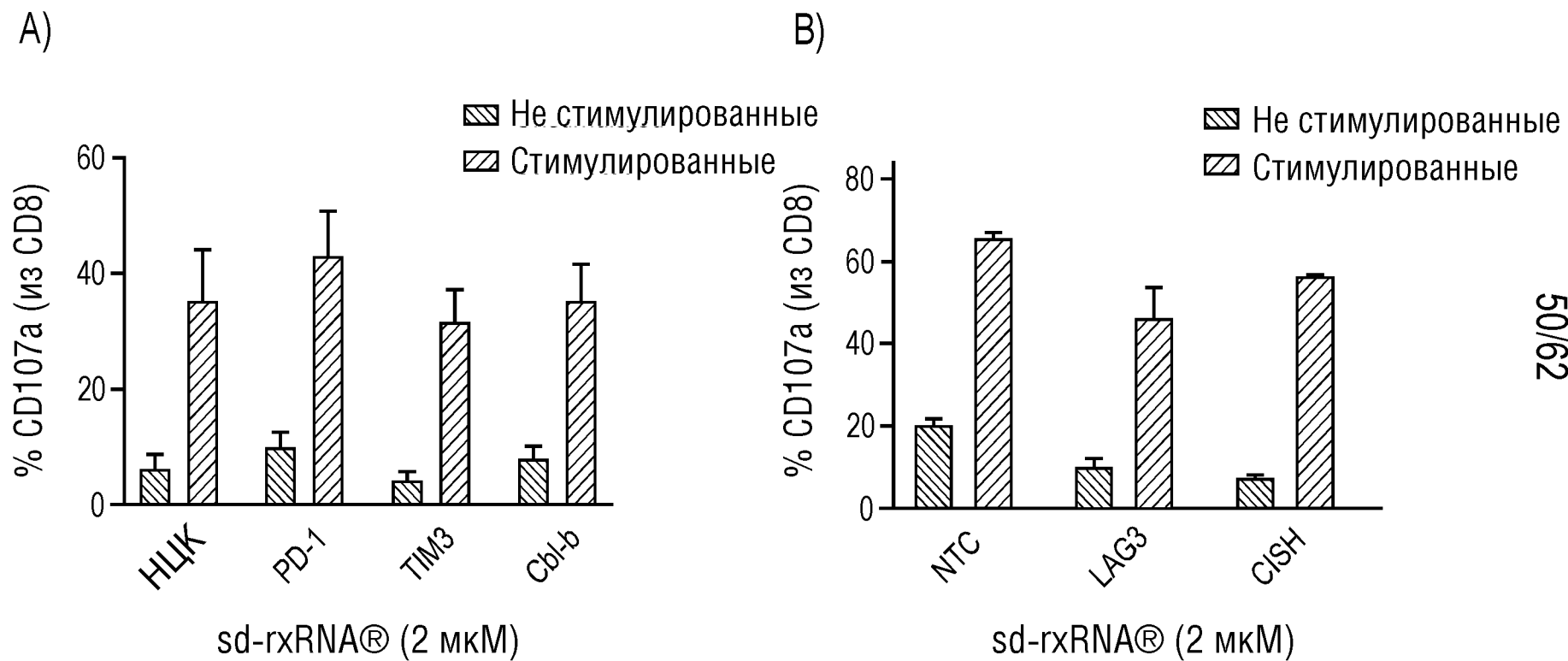
ФИГ.45В



ФИГ.46



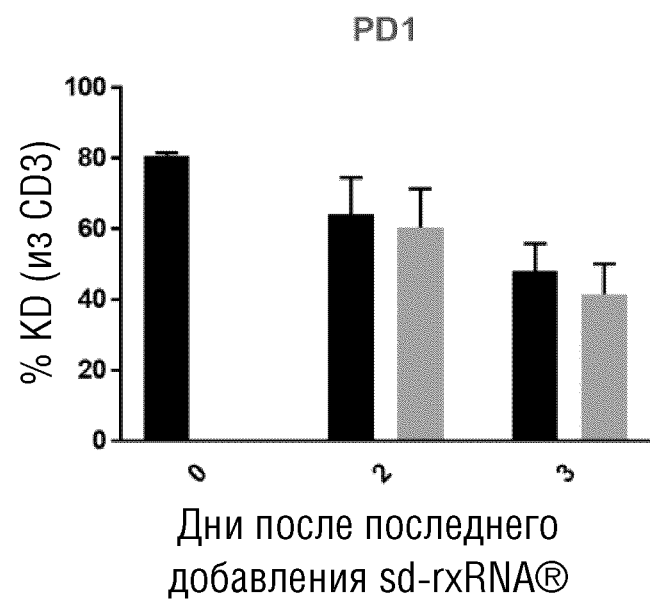
ФИГ.47А-В



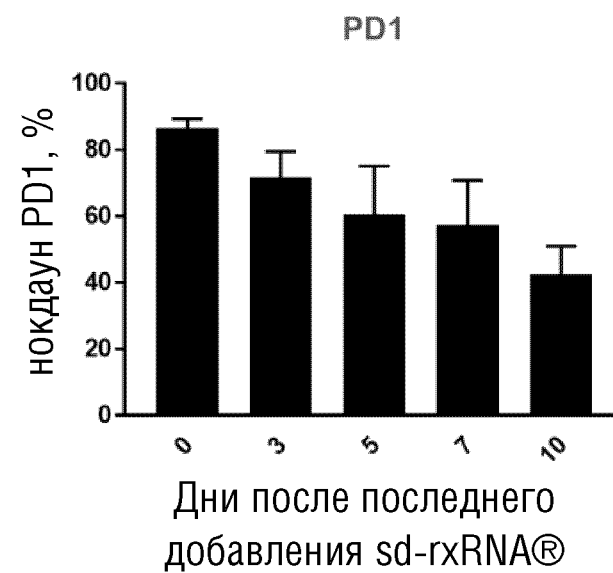
50/62

ФИГ.47С-D

С)

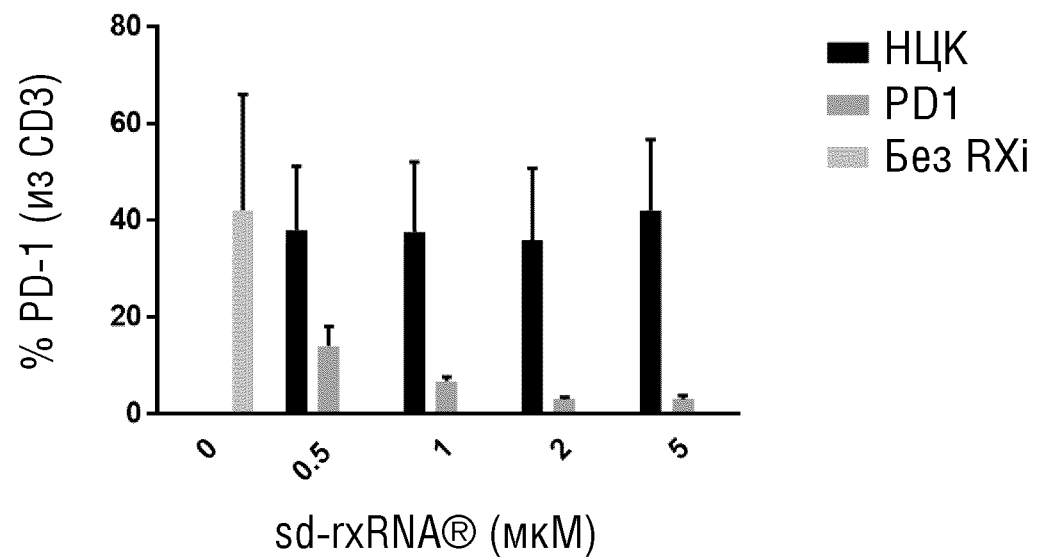


D)

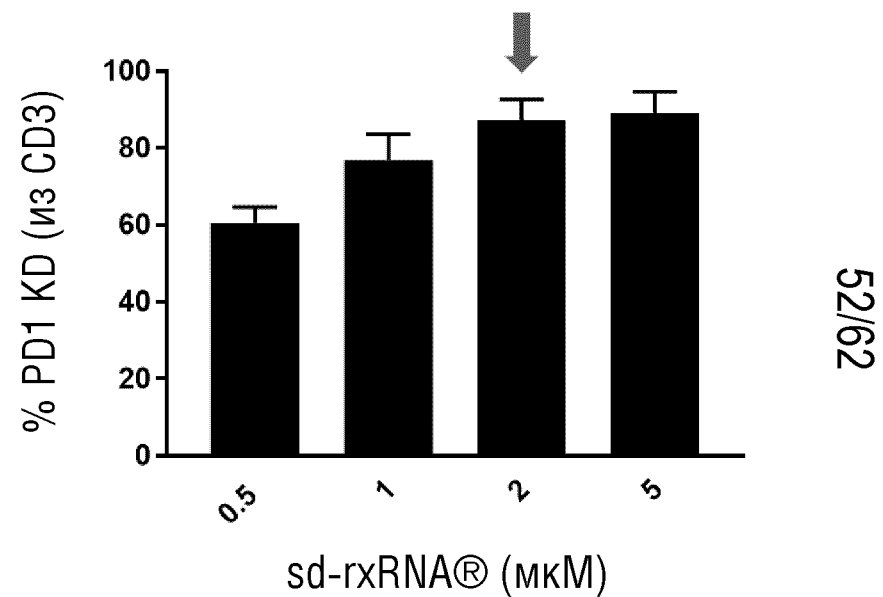


ФИГ.47E-F

E)

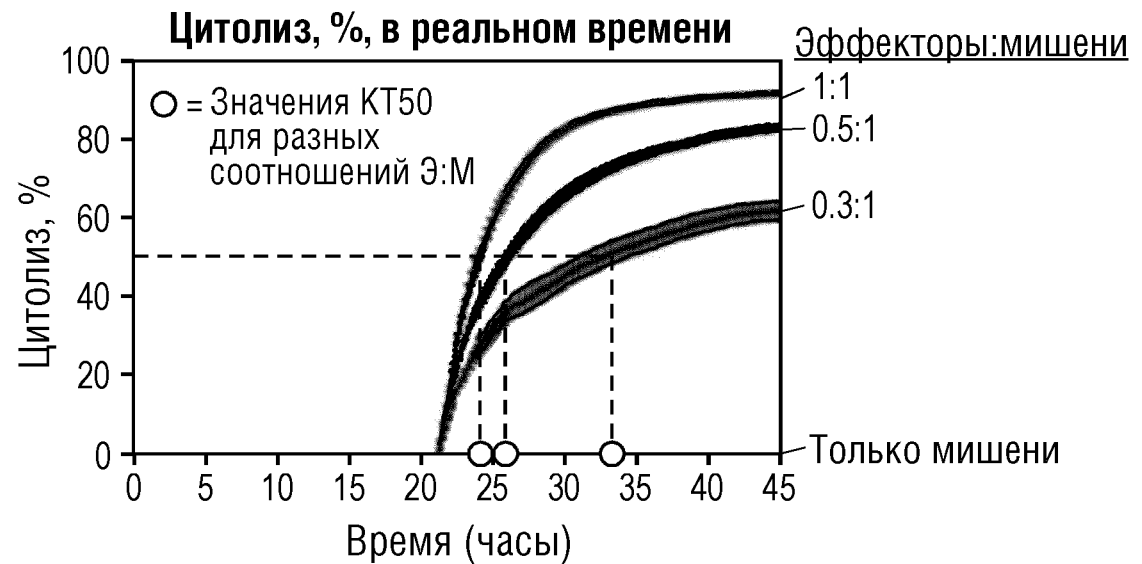
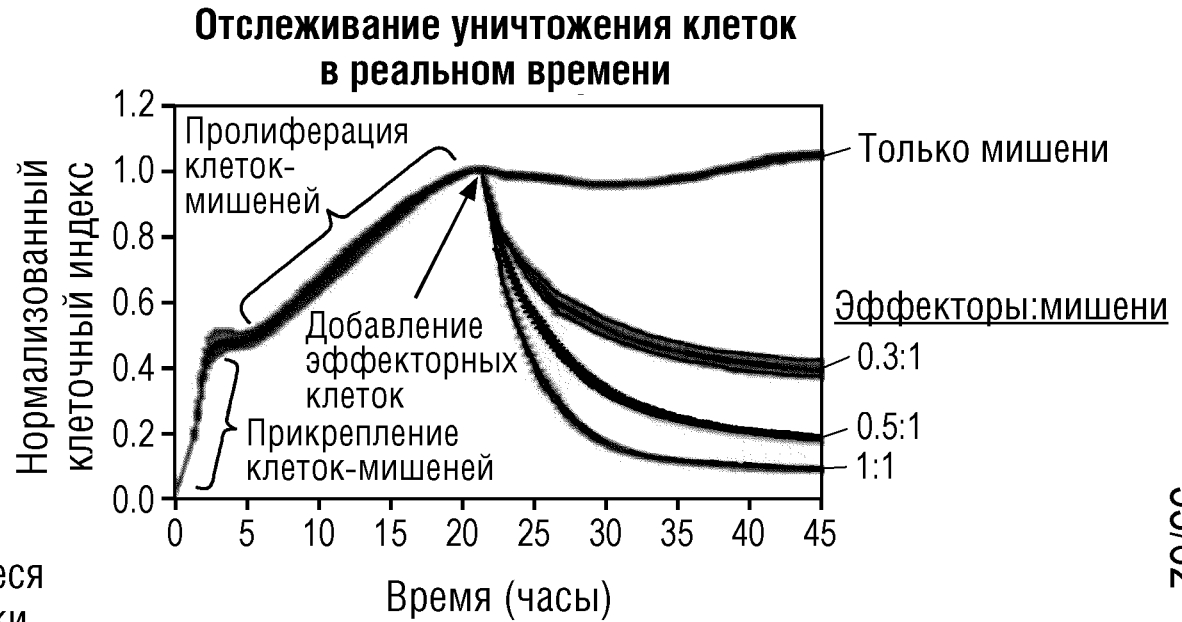
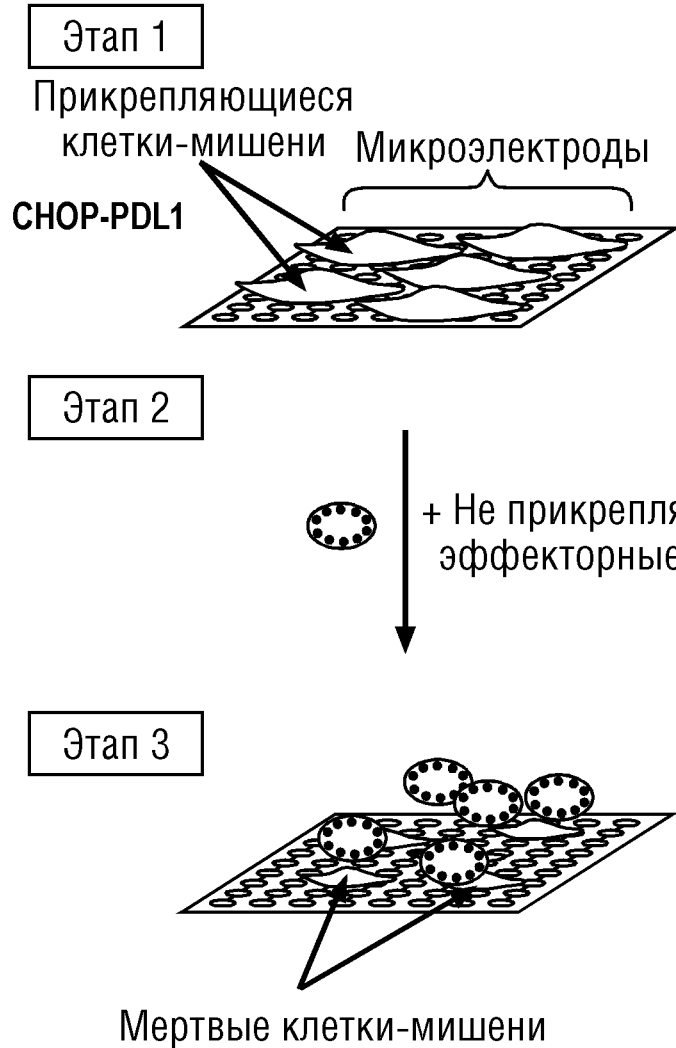


F)

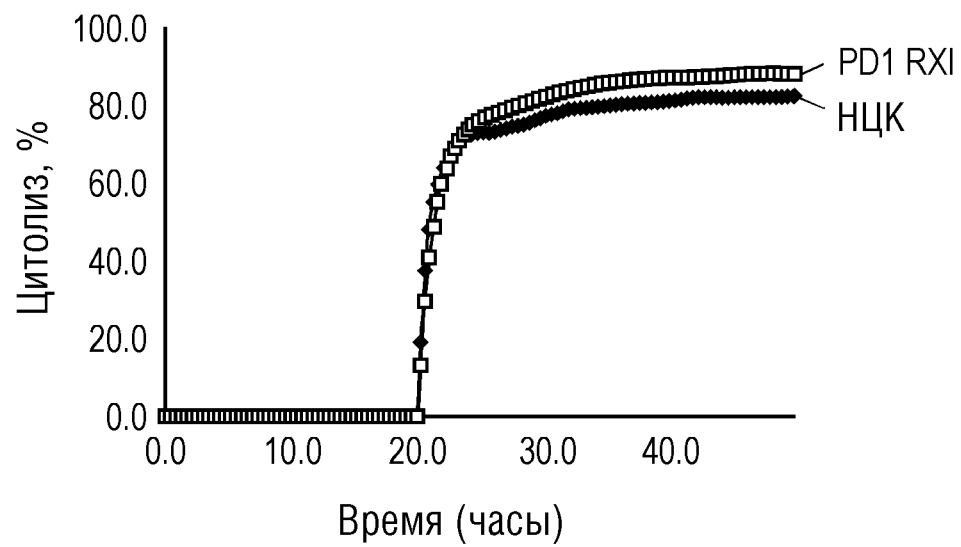
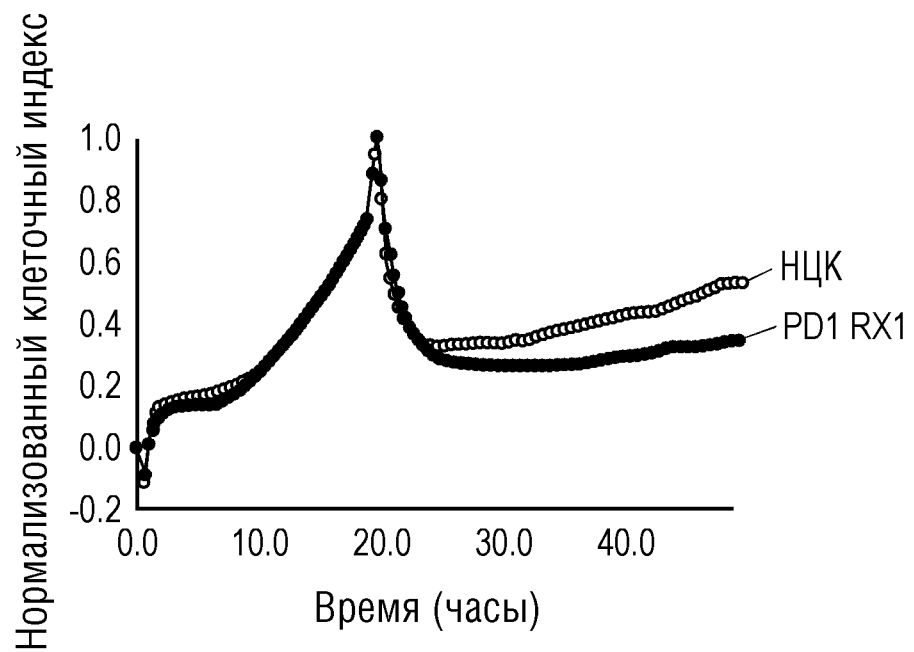


52/62

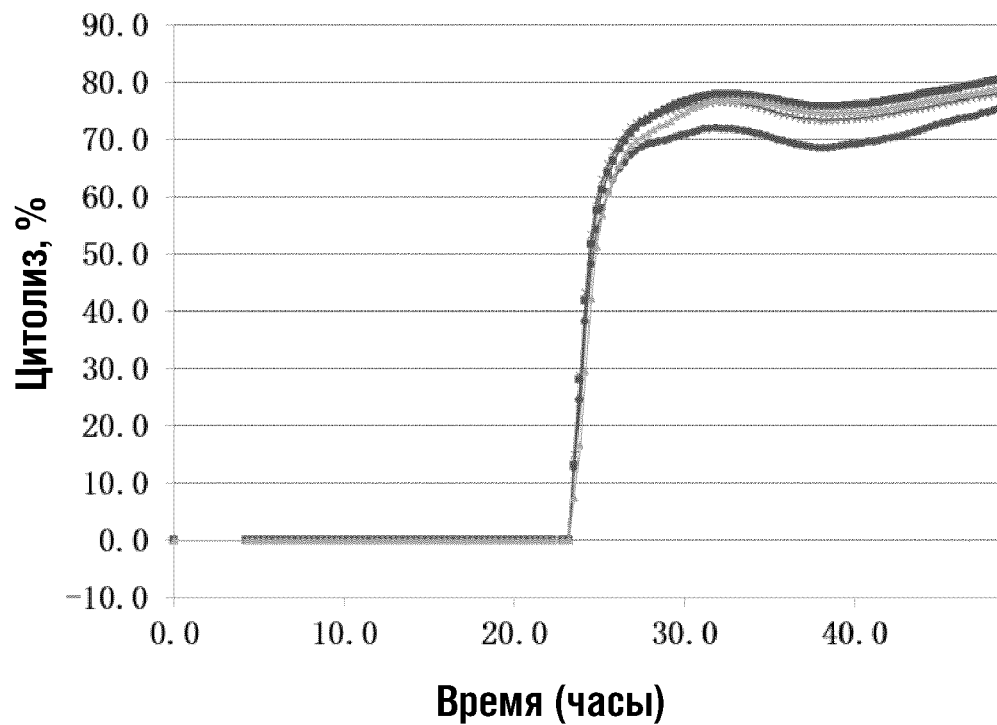
ФИГ.48



ФИГ.49А



ФИГ.49В



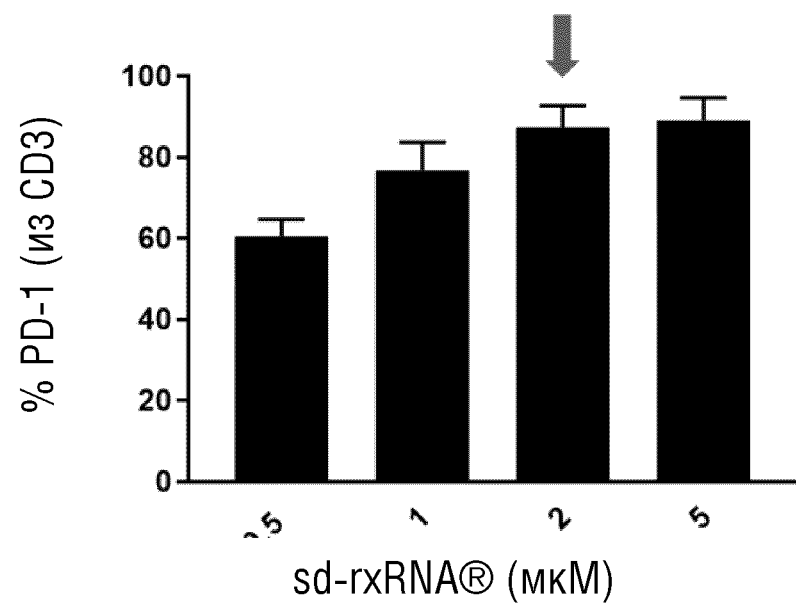
- M1033NTC + aPD-1
- M1033PD1 + aPD-1
- M1033NTC
- M1033PD1

	Эффективность KD	% от экспрессии PD-1 в контрольных клетках
	78,23	50

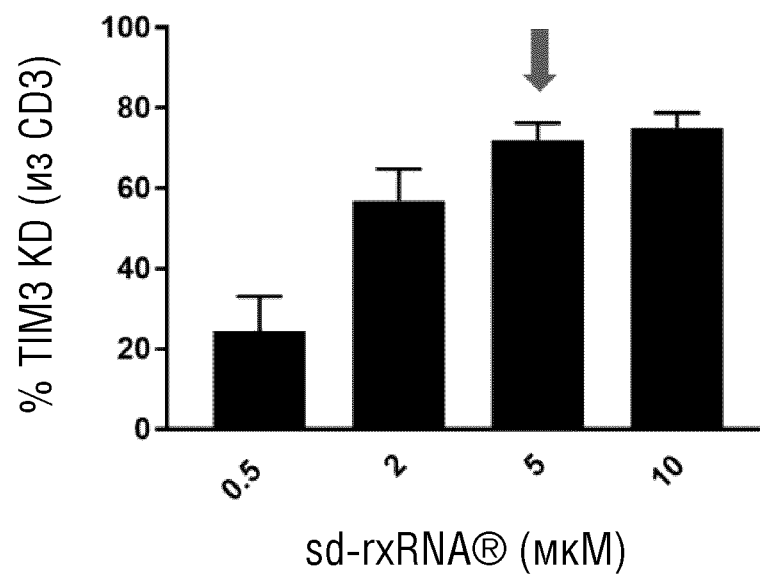
55/62

ФИГ.50

A)

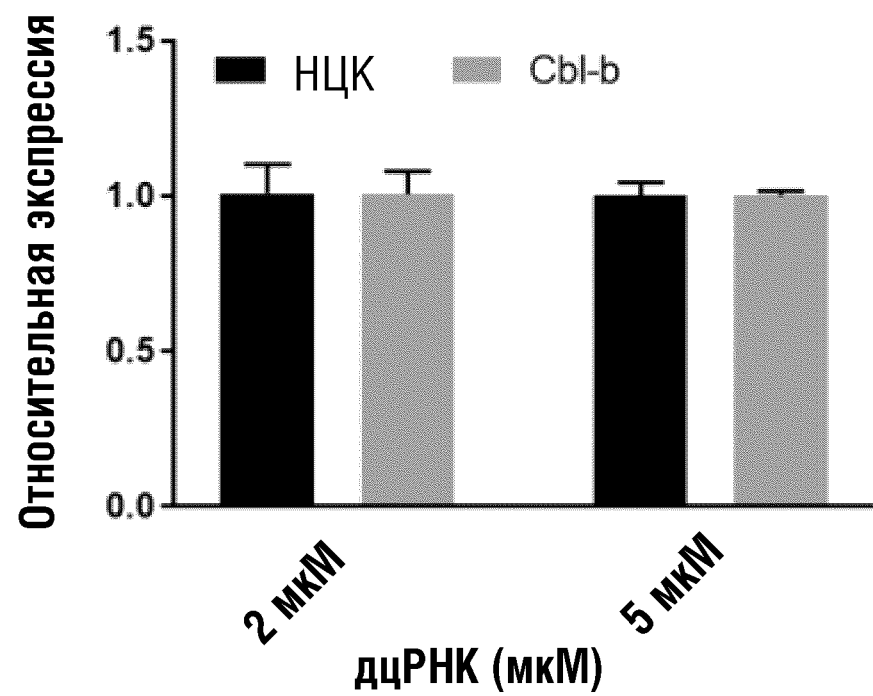


B)



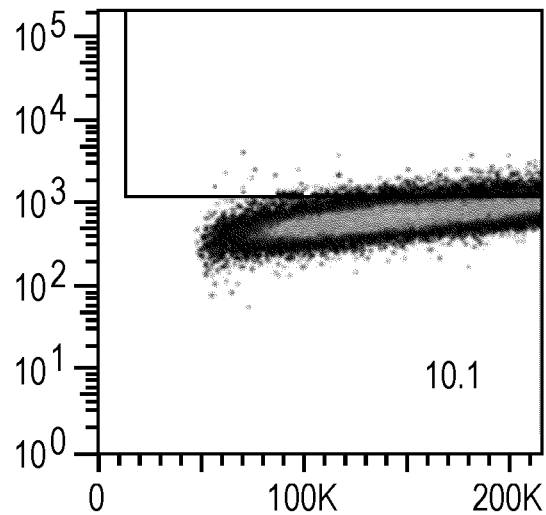
56/62

ФИГ.51А

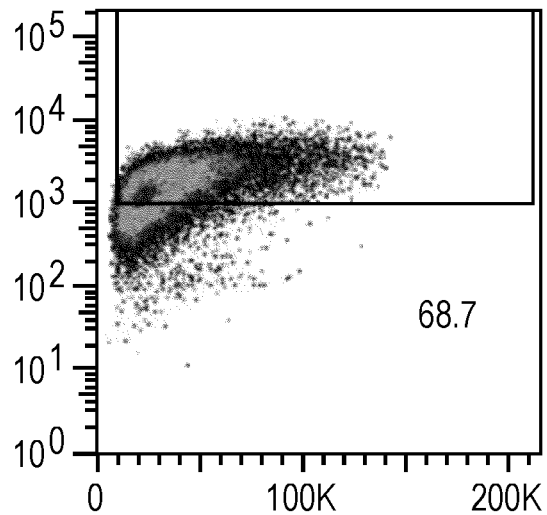


ФИГ.51В

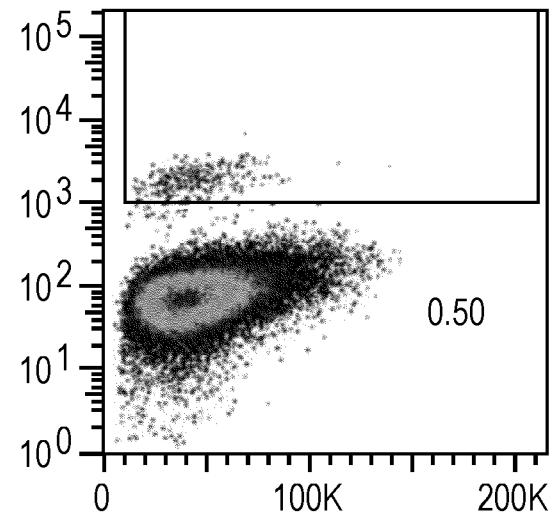
293



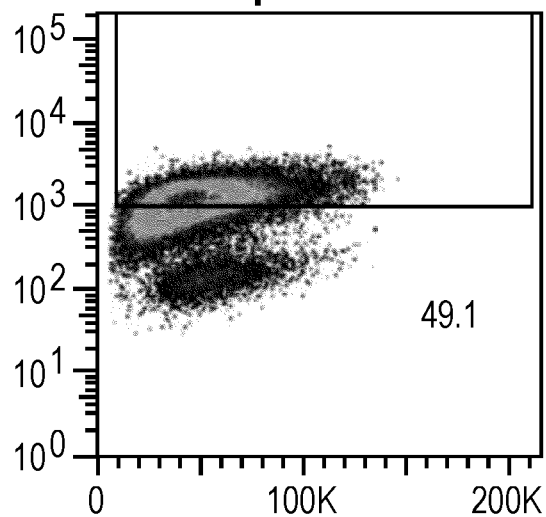
МКПК



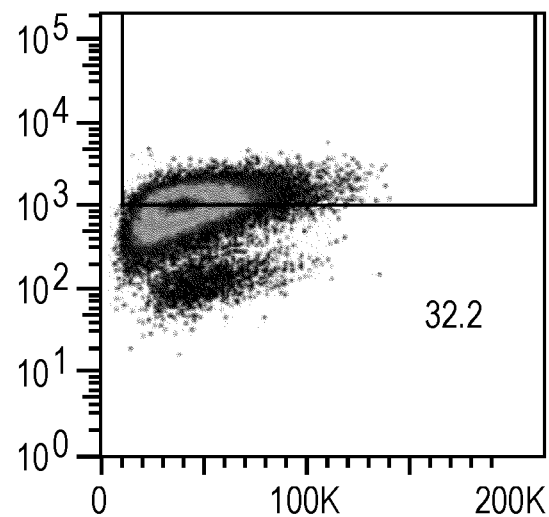
СbI-b FMO



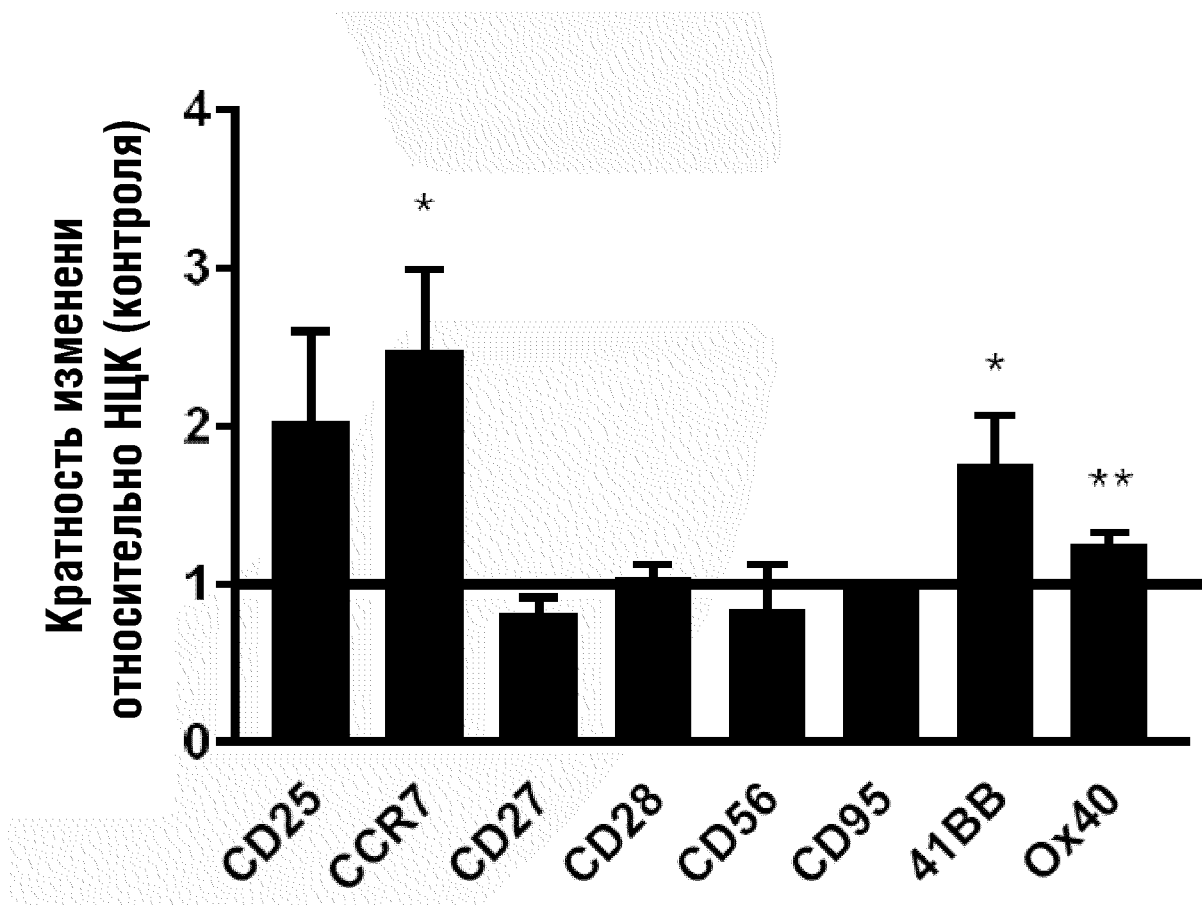
НЦК 2 мкМ



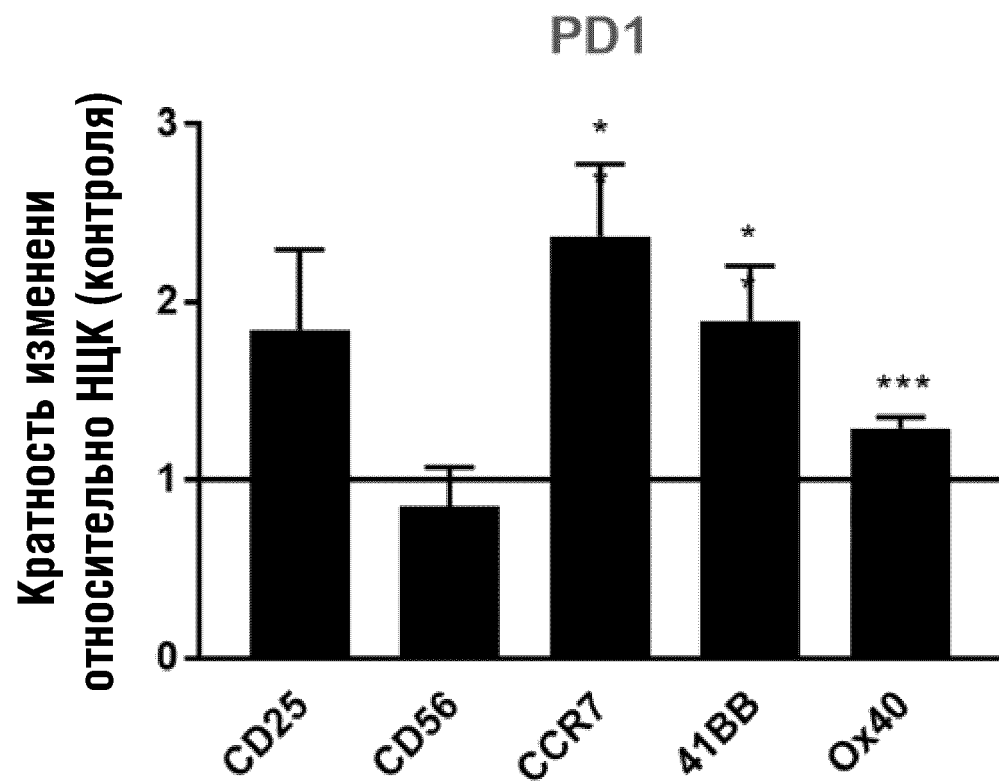
СbI-b 2 мкМ



ФИГ.52А

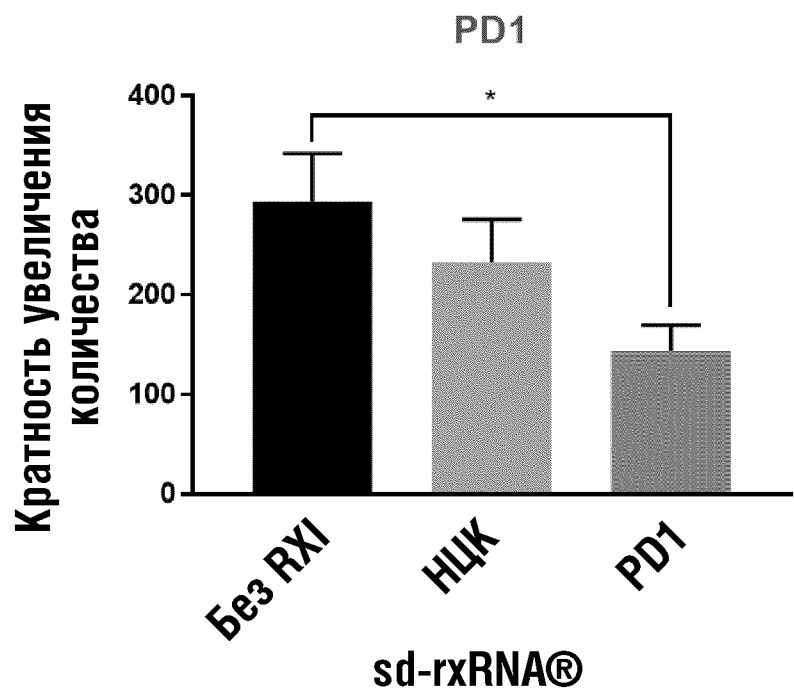


ФИГ.52В

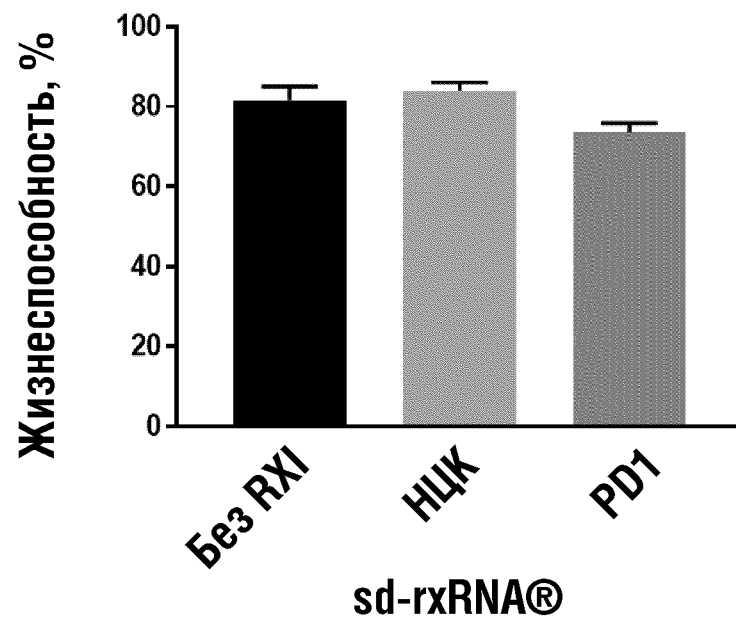


ФИГ.53

A)

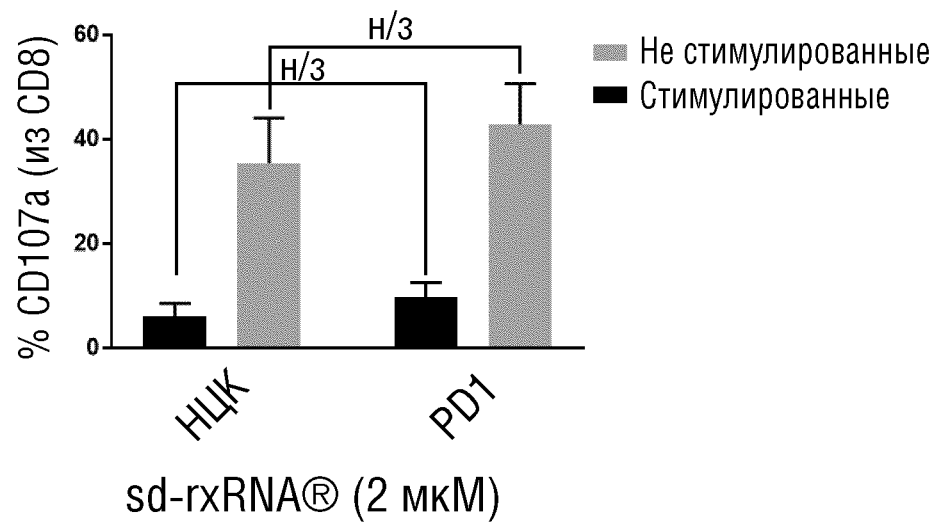


B)



ФИГ.54

A)



B)

