(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202092319 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.04

(22) Дата подачи заявки
2018.06.29

(51) Int. Cl. ***C12N 5/0783*** (2010.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
C12M 3/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ И ПРИМЕНЕНИЯ ИХ В ИММУНОТЕРАПИИ

(31) **15/940,901**
(32) **2018.03.29**
(33) **US**
(86) **PCT/US2018/040474**
(87) **WO 2019/190579 2019.10.03**

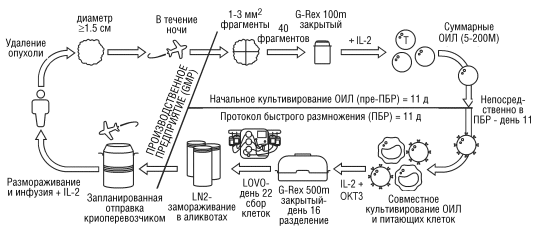
(71) Заявитель:
АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Уорделл Сет, Бендер Джеймс (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к усовершенствованным и/или сокращенным способам размножения ОИЛ и получения терапевтических популяций ОИЛ, включая новые способы размножения популяций ОИЛ в закрытой системе, что приводит к повышению активности, улучшению фенотипа и повышению уровня метаболического здоровья ОИЛ за более короткий период времени, при этом уменьшается микробное загрязнение и снижаются затраты. Такие ОИЛ находят применение в терапевтических схемах лечения.

Способ 2А – 22 дня процесс, 2-3 дня сбор клеток/отправка



202092319 A1

202092319 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564962EA/55

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ И ПРИМЕНЕНИЯ ИХ В ИММУНОТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет на основании патентной заявки США 15/940901, поданной 29 марта 2018 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] 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 IL-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. Однако, хотя ПБР может приводить к 1000-кратному увеличению количества ОИЛ в течение 14-дневного периода, для него 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 (OKT3) и высокие дозы IL-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. 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.

[0003] Современные способы производства ОИЛ ограничены длительностью процесса, стоимостью, соображениями стерильности и другими факторами, описанными в настоящем документе, потенциал для коммерциализации таких способов имеет серьезные ограничения, и вследствие этих и других причин, в настоящее время такие коммерческие способы отсутствуют. Существует острая необходимость в 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.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение относится к усовершенствованным и/или сокращенным способам размножения ОИЛ и получения терапевтических популяций ОИЛ.

[0005] 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 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, OKT-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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[0006] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

[0007] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

[0008] 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.

[0009] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

[0010] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[0011] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

[0012] 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 $мм^3$.

[0013] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

[0014] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

[0015] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[0016] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток на этапе (d) дополнительно содержит IL-15 и/или IL-21.

[0017] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-2 составляет от примерно 10000 МЕ/мл до примерно 5000 МЕ/мл.

[0018] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-15 составляет от примерно 500 МЕ/мл до примерно 100 МЕ/мл.

[0019] В некоторых вариантах осуществления концентрация IL-21 составляет от примерно 20 МЕ/мл до примерно 0,5 МЕ/мл.

[0020] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[0021] В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО). В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% диметилсульфоксида (ДМСО).

[0022] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0023] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

[0024] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

[0025] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

[0026] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение

периода времени от примерно 15 дней до примерно 20 дней.

[0027] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

[0028] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

[0029] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее.

[0030] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 20 дней или менее.

[0031] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 15 дней или менее.

[0032] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 10 дней или менее.

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

[0034] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

[0035] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

[0036] 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 по сравнению с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

[0038] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенной активностью, повышенным продуцированием интерферона-гамма, повышенной поликлональностью, повышенным средним уровнем IP-10 и/или повышенным средним уровнем MCP-1 при введении субъекту.

[0039] 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.

[0040] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более

длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0041] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0042] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[0043] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (g) вводят инфузией пациенту.

[0044] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

[0045] 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 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, OKT-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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

(f) перенос собранной популяции ОИЛ из этапа (e) в инфузионный мешок, при

этом перенос из этапа (e) в (f) происходит без открывания системы;

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

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

[0046] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

[0047] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

[0048] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

[0049] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

[0050] В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

[0051] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[0052] 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).

[0053] 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.

[0054] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0055] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ демонстрируют

повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0056] 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.

[0057] В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки и НМРЛ.

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

[0059] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой ПКГШ.

[0060] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки.

[0061] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой НМРЛ.

[0062] Настоящее изобретение также относится к способам размножения опухоль-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 и, необязательно, OKT-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, с получением 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 (a) к этапу (b) происходит без открывания системы;

(c) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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 (c) происходит без открывания системы;

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

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

[0063] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

[0064] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

[0065] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования.

[0066] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

[0067] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[0068] В некоторых вариантах осуществления МКПК являются облученными и аллогенными.

[0069] Способ по п.68, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (c).

[0070] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[0071] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[0072] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

[0073] 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 $мм^3$.

[0074] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

[0075] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

[0076] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

[0077] 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™.

[0078] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[0079] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого периода на этапе

(b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0080] В некоторых вариантах осуществления каждый из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 11 дней.

[0081] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

[0082] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

[0083] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

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

[0085] В некоторых вариантах осуществления (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[0086] 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 по сравнению с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

[0087] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

[0088] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0089] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[0090] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[0091] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

[0092] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор.

[0093] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет

собой G-REX 10.

[0094] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 100.

[0095] 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.

[0096] В некоторых вариантах осуществления культура клеток имеет соотношение, составляющее 2,5×109 АПК к 100×10^6 ОИЛ.

[0097] 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.

[0098] В некоторых вариантах осуществления культура клеток имеет соотношение, составляющее $2,5\times10^9$ АПК к 100×10^6 ОИЛ.

[0099] 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 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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

[00100] 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. В некоторых вариантах осуществления популяция ОИЛ предназначена для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, способами, описанными выше в настоящем документе, при этом способ дополнительно включает один или более признаков, описанных выше в настоящем документе.

[00101] Настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающим:

(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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), 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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), а также антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[00102] Настоящее изобретение 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 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), 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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), а также антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

[00103] В некоторых вариантах осуществления агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) представляет собой анти-4-1BB антитело. 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.

[00104] Настоящее изобретение также относится к композиции для

криоконсервирования, содержащей популяцию ОИЛ, описанную выше в настоящем документе, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов.

[00105] В некоторых вариантах осуществления композиция для криоконсервирования дополнительно содержит один или более стабилизаторов и один или более факторов роста лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления один или более стабилизаторов включают человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), и один или более факторов роста лимфоцитов включают IL-2. В некоторых вариантах осуществления композиция, необязательно, содержит ОКТ-3.

[00106] В некоторых вариантах осуществления ДМСО и раствор электролитов присутствуют в соотношении от примерно 1,1:1 до примерно 1:1,1. В некоторых вариантах осуществления ДМСО и раствор электролитов присутствуют в соотношении примерно 1:1.

[00107] В некоторых вариантах осуществления 100 мл композиции для криоконсервирования содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^6 до примерно 9×10^{14}, криопротекторную среду, содержащую ДМСО, в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, ЧСА в количестве от примерно 0,1 г до примерно 1,0 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,005 мг.

[00108] В некоторых вариантах осуществления 100 мл композиции для криоконсервирования содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

[00109] В некоторых вариантах осуществления 100 мл композиции для криоконсервирования содержат преимущественно популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

[00110] В некоторых вариантах осуществления композиция предназначена для использования в лечении субъекта, страдающего от рака.

[00111] Настоящее изобретение также относится к композиции для криоконсервирования, содержащей популяцию ОИЛ, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при

этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

[00112] Настоящее изобретение также относится к композиции для криоконсервирования, состоящей преимущественно из популяции ОИЛ, криопротекторной среды, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО), и раствора электролитов, при этом 100 мл композиции состоят преимущественно из популяции ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторной среды в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствора электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

[00113] Настоящее изобретение также относится к инфузионному мешку, содержащему композицию для криоконсервирования, описанную выше в настоящем документе.

[00114] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[00115] Настоящее изобретение также относится к мешку для хранения, содержащему композицию для криоконсервирования, описанную выше в настоящем документе.

[00116] В некоторых вариантах осуществления мешок для хранения по п. 54 представляет собой мешок для заморозки CryoStore CS750.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00117] **Фигура 1:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа 2A, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00118] **Фигура 2:** Показано сравнение между способом 1C и вариантом осуществления способа 2A для производства ОИЛ.

[00119] **Фигура 3:** Представлен план-график способа 1C.

[00120] **Фигура 4:** Показан способ по варианту осуществления ОИЛ-терапии с использованием способа 2A для производства ОИЛ, включающий этапы введения и совместной терапии, для более высокого количества клеток.

[00121] **Фигура 5:** Показан способ по варианту осуществления ОИЛ-терапии с использованием способа 2A для производства ОИЛ, включающий этапы введения и совместной терапии, для более низкого количества клеток.

[00122] **Фигура 6:** Представлена подробная схема для варианта осуществления способа 2A.

[00123] **Фигура 7:** Показана характеризация ОИЛ, полученных с использованием варианта осуществления способа 2A, путем сравнения экспрессии интерферона-гамма (IFN-γ) у свежих ОИЛ и размороженных ОИЛ.

[00124] **Фигура 8:** Показана характеризация ОИЛ, полученных с использованием

варианта осуществления способа 2A, путем изучения экспрессии CD3 в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ.

[00125] Показана характеризация ОИЛ, полученных с использованием варианта осуществления способа 2A, путем изучения извлечения свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ.

[00126] **Фигура 10:** Показана характеризация ОИЛ, полученных с использованием варианта осуществления способа 2A, путем изучения жизнеспособности свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ.

[00127] **Фигура 11A-11C:** Показаны основные этапы варианта осуществления способа 2A, включая этапы криоконсервирования.

[00128] **Фигура 12:** Показано количество клеток, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00129] **Фигура 13:** Показана жизнеспособность, в процентах, клеток, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00130] **Фигура 14:** Показаны процентные доли CD45 и CD3 клеток (то есть, T-клеток), при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00131] **Фигура 15:** Показана секреция IFN-γ в случае использования способа 1C и варианта осуществления способа 2A, при измерении в анализе, отличном от анализа, используемого для получения данных на Фигурах 80 и 98.

[00132] **Фигура 16:** Показана секреция IFN-γ в случае использования способа 1C и варианта осуществления способа 2A, при измерении в анализе, отличном от анализа, используемого для получения данных на Фигурах 80 и 98.

[00133] **Фигура 17:** Показаны процентные доли TCR a/b и NK-клеток, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00134] **Фигура 18:** Показаны процентные доли $CD8^+$ и $CD4^+$ клеток, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A, а также соотношение между всеми подгруппами.

[00135] **Фигура 19:** Показаны процентные доли подгрупп клеток памяти, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00136] **Фигура 20:** Показана экспрессия, в процентах, PD-1, LAG-3 и TIM-3, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00137] **Фигура 21:** Показана экспрессия, в процентах, 4-1BB, CD69 и KLRG1, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00138] **Фигура 22:** Показана экспрессия, в процентах, TIGIT, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и

варианта осуществления способа 2A.

[00139] **Фигура 23:** Показана экспрессия, в процентах, CD27 и CD28, при измерении методом проточной цитометрии, для ОИЛ, полученных с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00140] **Фигура 24:** Показаны результаты определения длины теломер в анализе Flow-FISH.

[00141] **Фигура 25:** Показаны результаты определения длины теломер в анализе Flow-FISH (после исключения выбросов данных).

[00142] **Фигура 26:** Показан дизайн клинического исследования, включающего группы пациентов, получающих лечение с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00143] **Фигура 27:** Иллюстративная схема технологического процесса способа 2A с описанием этапов A-F.

[00144] **Фигура 28A-28C:** Схема технологического процесса способа 2A.

[00145] **Фигура 29:** Схема технологического процесса для плана сбора данных в способе 2A.

[00146] **Фигура 30:** Сравнение жизнеспособности свежих и размороженных ОИЛ.

[00147] **Фигура 31**: Размножение свежих и размороженных ОИЛ в ре-ПБР культуре.

[00148] **Фигура 32:** Нормальные лабораторные показатели метаболитов крови.

[00149] **Фигура 33A-33B:** Анализ метаболитов пре-ПБР ОИЛ в способе 2A.

[00150] **Фигура 34:** Количественное определение IL-2 в клеточной культуре пре-ПБР ОИЛ в способе 2A.

[00151] **Фигура 35:** Секреция цитотоксического цитокина IFN-γ после стимуляции ОИЛ при помощи анти-CD3, анти-CD28 и анти-4-1BB.

[00152] **Фигура 36:** Секреция гранзима B после стимуляции ОИЛ при помощи анти-CD3, анти-CD28 и анти-4-1BB.

[00153] **Фигура 37A-37B:** TCR αβ+ ОИЛ. Большинство человеческих CD3+ T-клеток экспрессируют рецепторы, образованные α и β-цепями, которые узнают антигены рестрицированным по MHC образом. A) За исключением M1061, свежий и размороженный препараты ОИЛ имели 80% или более экспрессирующих TCR αβ+ ОИЛ. Как свежие, так и размороженные, ОИЛ имели сопоставимую экспрессию TCR αβ (p-значение – 0,9582). Несмотря на то, что имело место уменьшение количества экспрессирующих TCR αβ+ ОИЛ после ре-ПБР, это уменьшение было незначимым в ре-ПБР ОИЛ (p=0,24). B) Имело место уменьшение на 9,2% и 15,7% свежих и размороженных ре-ПБР ОИЛ, экспрессирующих TCR αβ, в сравнении со свежими и размороженными ОИЛ, соответственно.

[00154] **Фигура 38A-38B:** TCRαβ-CD56+. Опухоль-инфильтрирующие клетки - естественные киллеры (NK) и NKT-клетки также обладают способностью лизировать клетки, лишенные экспрессии MHC, а также CD1-представленного липидного антигена, и

продуцировать иммунорегуляторные цитокины. Однако интенсивная инфильтрация NK-клеток связана с запущенным заболеванием и может способствовать развитию рака. На Фигуре A показано, что во всех случаях, за исключением M1063, имело место небольшое, хотя и не значимое, снижение популяции NK в размороженных ОИЛ в сравнении со свежими ОИЛ (p=0,27). Отсутствовала существенная разница между популяцией ре-ПБР ОИЛ (p=0,88). Свежие ОИЛ, свежие ре-ПБР ОИЛ, и размороженные ре-ПБР ОИЛ демонстрировали сходную экспрессию CD56, как показано на Фигура B. Размороженный препарат ОИЛ содержал меньше (1,9 ± 1,3) NK-экспрессирующих клеток, чем свежие ОИЛ (3,0 ± 2,2), возможно, вследствие процедуры криогенного замораживания.

[00155] **Фигура 39A-39B:** CD4+ клетки. Отсутствовала существенная разница в CD4 популяции в отдельных условиях. На Фигуре A показаны средние значения для CD4 популяции в каждом случае. В таблице на Фигуре B приведены значения SD и SEM. Имеет место небольшое уменьшение CD4 популяции в свежей ре-ПБР популяции, главным образом, вследствие уменьшения CD4 в свежей ре-ПБР популяции в EP11001T.

[00156] **Фигура 40A-40B:** CD8+ клетки. A) Во всех случаях, за исключением EP11001T, как свежие, так и размороженные, ОИЛ демонстрировали наличие сопоставимых CD8+ популяций (p=0,10, значимая разница отсутствует). В большинстве экспериментов имело место небольшое уменьшение количества CD8+ экспрессирующих ОИЛ в препарате свежих ре-ПБР ОИЛ (исключение составляли M1061T и M1065T). Имело место примерно 10-30% уменьшение CD8+ популяции в размороженных ре-ПБР ОИЛ. Сравнение ре-ПБР ОИЛ из свежих и размороженных ОИЛ показало значимую разницу (p=0,03, критерий Стьюдента). На Фигуре B приведены средние значения для CD8+ экспрессирующих ОИЛ во всех условиях. Аналогичные результаты были получены для свежих и размороженных ОИЛ. Однако имело место 10,8% уменьшение CD8+ популяции в препарате размороженных ре-ПБР ОИЛ в сравнении со свежими ре-ПБР ОИЛ.

[00157] **Фигура 41A-41B:** CD4+CD154+ клетки. CD154, также известный как CD40L, представляет собой маркер активированных Т-клеток. Фигура A: наблюдали отсутствие существенной разницы в CD4+CD154+ популяции в разных условиях, однако имело место уменьшение на 34,1% в EP11001T свежих ре-ПБР CD4+ ОИЛ. Экспрессию CD154 не измеряли в M1061T и M1062T, поскольку эти эксперименты проводили до введения в действие расширенной фенотипической панели. Фигура B: небольшое уменьшение в случае размороженных ОИЛ может быть объяснено тем, что CD154 не измеряли в M1061T и M1062T. Во всех условиях наблюдали в высокой степени сопоставимую экспрессию CD154 в CD4 популяции, что указывало на активированные CD4+ Т-клетки.

[00158] **Фигура 42A-42B:** CD8+CD154+ клетки. Также анализировали маркер активации CD154, экспрессируемый на CD8+ ОИЛ. A) В целом, экспрессия CD154 была ниже в CD8+ популяции в препарате свежих и размороженных ОИЛ. Это не удивительно, поскольку CD154 экспрессируется в основном в активированных CD4+ Т-клетках. B

случаях, когда экспрессию CD154 измеряли как в свежих, так и в размороженных, ОИЛ наблюдали либо отсутствие разницы, либо увеличение экспрессии CD154 в препаратах размороженных ОИЛ. На основании критерия Стьюдента было показано, что отсутствовала существенная разница между этими двумя условиями. Увеличение экспрессии CD154 в размороженных ре-ПБР клетках в сравнении со свежими ре-ПБР клетками было обнаружено во всех экспериментах (p=0,02). B) Увеличение экспрессии CD154 наблюдали как в размороженных ОИЛ, так и в препаратах размороженных ре-ПБР ОИЛ, в сравнении с соответствующими препаратами. Размороженные ре-ПБР ОИЛ демонстрировали увеличение на 29,1% экспрессии CD154 в сравнении со свежими ре-ПБР ОИЛ.

[00159] **Фигура 43A-43B:** CD4+CD69+ клетки. CD69 представляет собой маркер ранней активации в Т-клетках после стимуляции или активации. A) Во всех ОИЛ, за исключением EP11001T, как свежие, так и размороженные, ре-ПБР клетки демонстрировали умеренное увеличение экспрессии CD69, возможно, вследствие продолжительности ре-ПБР (7 дней вместо 11 дней). Отсутствовала разница между свежими и размороженными ОИЛ (p=0,89). Также отсутствовала разница между свежими и размороженными ре-ПБР (p=0,82). B) Незначительное увеличение экспрессии CD69 наблюдали в препаратах ре-ПБР ОИЛ. (Примечание: окрашивание на CD69 не проводили ни для M1061T, ни для M1062T, размороженных препаратов ОИЛ. Экспрессия CD69 в свежем препарате ОИЛ M1061T составляла 33,9%).

[00160] **Фигура 44A-44B:** CD8+CD69+ клетки. Как было отмечено для CD4+ популяции, на Фигуре A показано увеличение экспрессии CD69 в CD8+ ре-ПБР ОИЛ. Экспрессия CD69 существенно не отличалась в свежих и размороженных ОИЛ (p=0,68), или в свежих и размороженных ре-ПБР ОИЛ (p=0,76). Фигура B подтверждает тот факт, что имеет место умеренное увеличение экспрессии CD69 в препарате ре-ПБР ОИЛ.

[00161] **Фигура 45A-45B:** CD4+CD137+ клетки. CD137 (4-11313) представляет собой Т-клеточный костимулирующий рецептор, индуцируемый при активации TCR. Он активируется на CD4+ и CD8+ Т-клетках. A) Имело место сильное увеличение экспрессии CD137 в популяции ре-ПБР ОИЛ после 7 дней стимуляции. Однако не наблюдали никакой разницы между свежими и размороженными ОИЛ или между свежими и размороженными ре-ПБР ОИЛ (p <0,05 в обоих случаях, Фигура B подтверждает это наблюдение). Кроме того, в размороженных ОИЛ наблюдали умеренное уменьшение экспрессии CD137. Увеличение экспрессии CD137 в ре-ПБР ОИЛ может быть объяснено вторым раундом стимуляции в 7-дневном ре-ПБР.

[00162] **Фигура 46A-46B:** CD8+CD137+ клетки. A) Наблюдали общее увеличение CD8+ популяции в препарате ре-ПБР. B) В препарате свежих ре-ПБР имело место увеличение на 33,4% экспрессии CD8+CD137+ в сравнении с препаратом свежих ОИЛ. Препарат размороженных ре-ПБР также демонстрировал 33,15% увеличение экспрессии CD137 в CD8+ популяции в сравнении с размороженными ОИЛ. Отсутствовала существенная разница между свежими и размороженными ре-ПБР ОИЛ. Аналогичную

ситуацию наблюдали при сравнении свежих ОИЛ с препаратом размороженных ОИЛ. Это увеличение экспрессии CD137 могло происходить вследствие второго раунда активации в ре-ПБР. (Следует отметить, что только 6 препаратов ОИЛ использовали для анализа, поскольку экспрессию CD137 не измеряли в 3 экспериментах).

[00163] **Фигура 47A-47B:** CD4+CM клетки. Популяцию центральных клеток памяти (CM) определяют по экспрессии CD45RA- (отрицательной) и CCR7+ (положительной). A) Наблюдали увеличение популяции CM в условиях ре-ПБР. В случае M1063T и M1064T наблюдали уменьшение характерной для CM экспрессии в CD4+ популяции, полученной из размороженных ОИЛ, в сравнении с препаратом свежих ОИЛ. Ни препараты свежих и размороженных ОИЛ (p=0,1658), ни препараты свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР ОИЛ (p=0,5535), не демонстрировали существенную разницу в популяции CM. B) Наблюдали 14,4% и 15,4% увеличение популяции CM в свежих и размороженных ре-ПБР ОИЛ в сравнении со свежими и размороженными ОИЛ, соответственно.

[00164] **Фигура 48A-48B:** CD8+CM клетки. A) В CD8+ популяции наблюдали резкое увеличение характерной для CM экспрессии в препарате свежих ОИЛ, что не было обнаружено в препарате ОИЛ. Это увеличение не влияло на значимость (p=0,3086), свидетельствуя об отсутствии разницы между свежими и размороженными ОИЛ. Аналогичную тенденцию наблюдали также в препаратах ре-ПБР ОИЛ. Фигура 48B) Наблюдали общее увеличение популяции CM в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ. Числа показывают, что свежие ОИЛ и ре-ПБР ОИЛ имели разницу лишь ~2%; в случае свежих ОИЛ наблюдали очень высокое значение стандартного отклонения, что можно было отнести на счет M1064T; за исключением того, что характерная для CM экспрессия в M1064T была очень сходной в препарате свежих и размороженных ОИЛ (не показано).

[00165] **Фигура 49A-49B:** CD4+EM клетки. Популяцию эффекторных клеток памяти (EM) определяют по отсутствию экспрессии CCR7 и CD45RA. A) Как и ожидалось, CD4+ популяция из свежих и размороженных ОИЛ имела высокий уровень фенотипических признаков эффекторных клеток памяти. Резкое уменьшение характерной для эффекторных клеток памяти экспрессии наблюдали в ре-ПБР ОИЛ популяции M1056T. Кроме того, 5 других экспериментов показали уменьшение фенотипических признаков эффекторных клеток памяти как в свежих, так и в размороженных ре-ПБР ОИЛ. B) Как в свежих, так и в размороженных, ОИЛ наблюдали сходную экспрессию фенотипических признаков эффекторных клеток памяти. Сравнение свежих и свежих ре-ПБР ОИЛ показало уменьшение на 16% в последних. Аналогичное уменьшение наблюдали в размороженных ре-ПБР ОИЛ (9%) при сравнении с размороженными ОИЛ.

[00166] **Фигура 50A-50B:** CD8+EM клетки. A) Аналогичную картину увеличения количества эффекторных клеток памяти в свежих ОИЛ также наблюдали в CD8+ популяции. Исключение было отмечено в M1064T, где свежие ОИЛ имели лишь 20% профиля эффекторных клеток памяти; это происходило вследствие того, что 73% этих

ОИЛ имели фенотип СМ, как описано в пунктах А и В. Все образцы, демонстрирующие уменьшение популяции эффекторных клеток памяти, в CD4+ ОИЛ из препарата ре-ПБР имели ту же тенденцию в CD8+ ОИЛ. В) В отличие от популяции CD4+ ОИЛ, CD8+ ОИЛ демонстрировали аналогичный фенотип эффекторных клеток памяти в свежих, размороженных и ре-ПБР препаратах. (Следует отметить высокий показатель стандартного отклонения в случае свежих и размороженных ОИЛ, что является следствием низкого содержания популяции эффекторных клеток памяти в свежем препарате M1064T и отсутствия экспрессии в образцах размороженных ОИЛ M1061T).

[00167] **Фигура 51A-51B:** CD4+CD28+ клетки. Экспрессия CD28 наблюдается в молодых ОИЛ и уменьшается с возрастом. А) Даже при том, что наблюдали увеличение популяции СМ в ре-ПБР ОИЛ, уменьшение экспрессии CD28 было отмечено в качестве тенденции, свидетельствуя о том, что сам по себе статус СМ не может определять судьбу ОИЛ. Уменьшение экспрессии CD28 наблюдали в препарате ре-ПБР, за исключением CD4+ ОИЛ M1061T. В) было отмечено уменьшение на 8,89% в свежих, и на 5,71% в размороженных ОИЛ, в сравнении со препаратами свежих и размороженных ОИЛ, соответственно.

[00168] **Фигура 52A-52B:** CD8+CD28+ клетки. А) Экспрессия CD28 в популяции CD8+ ОИЛ была выше в свежих и размороженных ОИЛ, чем в препарате ре-ПБР. В большинстве случаев размороженные ре-ПБР ОИЛ демонстрировали резкое уменьшение в сравнении с размороженными ОИЛ и свежими ре-ПБР ОИЛ. Однако при помощи критерия Стьюдента было показано, что отсутствует существенная разница между свежими и размороженными ОИЛ ($p=0,3668$), а также между свежими и размороженными препаратами ре-ПБР ($p=0,7940$). В) В популяции CD4+ ОИЛ наблюдали уменьшение CD8+CD28+ популяции в свежих ре-ПБР (21,5%) и размороженных ре-ПБР (18,2%) при сравнении с их не рестимулированными аналогами.

[00169] **Фигура 53A-53B:** CD4+PD-1+ клетки. Экспрессия PD-1 в ОИЛ коррелирует с реагирующими на антиген и истощенными Т-клетками. Следовательно, не удивительно, что истощенный фенотип наблюдали в ОИЛ после ПБР в течение 11 дней. А) Этот истощенный фенотип либо сохранялся, либо увеличивался (в частности, EP11001T и M1056T) в препарате размороженных ОИЛ. Отсутствовала существенная разница между препаратами свежих и размороженных ОИЛ ($p=0,9809$). Аналогичную тенденцию наблюдали в свежих, при сравнении с размороженными, ре-ПБР ОИЛ ($p=0,0912$). В) Свежие ре-ПБР демонстрировали умеренное уменьшение экспрессии PD-1 в популяции CD4+ ОИЛ. Во всех остальных условиях сохранялась сопоставимая картина экспрессии PD-1. Наблюдали уменьшение или отсутствие изменения экспрессии PD-1 в препарате свежих ре-ПБР в сравнении со всеми остальными условиями. Увеличение экспрессии PD-1 наблюдали в M1062T, M1063T (CD4+) и EP11001T (CD8+) в размороженном препарате ре-ПБР. Все другие размороженные препараты ре-ПБР демонстрировали результаты, сопоставимые с результатами размороженного препарата.

[00170] **Фигура 54A-54B:** CD8+PD-1+ клетки. А) CD8+ популяция из свежего

препарата ОИЛ демонстрировала более истощенный фенотип, связанный с повышенной экспрессией PD-1. Исключение наблюдали в случае EP11001T, где CD8+ клетки размороженного препарата ОИЛ имели умеренное увеличение экспрессии PD-1 в сравнении со свежим препаратом ОИЛ. Имела место небольшая, хотя и не значимая, разница в экспрессии PD-1 в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ (p=0,3144). B) Свежий препарат ОИЛ имел небольшое, хотя и не значимое, увеличение экспрессии PD-1 в сравнении с размороженными ОИЛ (6,74%, или в 1,2-раза выше, чем в размороженных ОИЛ), это указывало на то, что размороженный препарат ОИЛ имел сопоставимый фенотипический паттерн.

[00171] **Фигура 55A-55B:** CD4+LAG3+ клетки. Истощенные Т-клетки экспрессируют на высоких уровнях ингибирующий рецептор LAG3 наряду с PD-1. A) CD4+ клетки размороженных ОИЛ имели немного, хотя и не значимо, более высокие уровни экспрессии LAG3 в сравнении со свежими ОИЛ (p=0,52). Исключение наблюдали в случае M1063T. В экспериментах, в которых измеряли экспрессию LAG3 в CD4+ клетках свежих и свежих ре-ПБР ОИЛ, наблюдали уменьшение экспрессии LAG3+ в свежих ре-ПБР образцах в сравнении со свежими ОИЛ. B) В целом, имело место умеренное уменьшение экспрессии LAG3 в свежем препарате ре-ПБР ОИЛ. Обратите внимание, что во избежание неточностей на Фигуре B, M1061T, M1062T и M1064T были исключены, поскольку экспрессию LAG3 не измеряли в свежих препаратах.

[00172] **Фигура 56A-56B:** CD8+LAG3+ клетки. A) Экспрессирующие LAG3+ CD8+ ОИЛ демонстрировали умеренное уменьшение экспрессии в экспериментах, за исключением M1063T, где наблюдали заметное уменьшение экспрессии LAG3 в свежих ре-ПБР ОИЛ. В целом, размороженные ре-ПБР ОИЛ демонстрировали значимое увеличение в 1,5 раза экспрессии LAG3 в сравнении со свежими ре-ПБР ОИЛ (p=0,0154). Однако существенная разница отсутствовала между препаратами свежих ОИЛ и размороженных ОИЛ (p=0,0884). B) Наблюдали уменьшение примерно на 30% экспрессии LAG3 в CD8+ ОИЛ из свежего ре-ПБР препарата в сравнении с размороженным препаратом ОИЛ. Как свежие, так и размороженные, ОИЛ были сопоставимы с размороженными ОИЛ, демонстрируя умеренное увеличение. (На данной фигуре M1061T, M1062T и M1064T опущены, поскольку экспрессию LAG3 не измеряли ни в свежих, ни в свежих ре-ПБР образцах ОИЛ).

[00173] **Фигура 57A-57B:** CD4+TIM-3+ клетки. A) Как наблюдали ранее в случае PD-1 и LAG3, было отмечено уменьшение экспрессии TIM-3 в свежих ре-ПБР ОИЛ в сравнении с размороженными ре-ПБР ОИЛ. Несмотря на это, отсутствовала существенная разница между свежими и размороженными ре-ПБР ОИЛ (p=0,2007). B) Никаких серьезных изменений в экспрессии TIM-3 не наблюдали в препаратах свежих, размороженных и размороженных ре-ПБР ОИЛ. Умеренное уменьшение на 9,2% экспрессии TIM-3 наблюдали в свежих ре-ПБР ОИЛ в сравнении с размороженным препаратом ре-ПБР.

[00174] **Фигура 58A-58B:** CD8+TIM-3+ клетки. A) Тенденцию в экспрессии TIM-3,

аналогичную той, которую наблюдали в популяции CD4+ клеток, также наблюдали в случае CD8+ ОИЛ. Свежие ре-ПБР ОИЛ имели наименее истощенный фенотип с низкой экспрессией TIM-3, демонстрируя существенную разницу в сравнении с размороженными ре-ПБР ОИЛ (p=0,0147). Сравнение результатов для PD-1, LAG3 и TIM-3 указывало на то, что свежие ре-ПБР ОИЛ имели менее истощенный фенотип с повышенным содержанием фенотипа CM. B) В сравнении с размороженным препаратом ре-ПБР ОИЛ свежие ре-ПБР ОИЛ демонстрировали значимое уменьшение на 22% экспрессии TIM-3. Как свежие, так и размороженные, ОИЛ имели сходные паттерны экспрессии TIM-3.

[00175] **Фигура 59**: Цитотоксический потенциал ОИЛ против клеточной линии-мишени P815.

[00176] **Фигура 60A-60F:** Метаболический дыхательный профиль свежих ОИЛ, свежих ре-ПБР ОИЛ и размороженных ре-ПБР ОИЛ. Базальная OCR (A), явная SRC (B), SRC2DG (C), скрытая SRC (D), базальная ECAR (E) и гликолитический резерв (F).

[00177] **Фигура 61A-61B:** Технологию Flow-FISH использовали для измерения средней длины теломерных повторов в 9 полученных способом 2A пост-ПБР размороженных препаратов ОИЛ. A) Данные представляют длину теломер, измеренную методом кПЦР, при сравнении ОИЛ с клетками 1301. B) Данные представляют длину теломер, измеренную в анализе Flow-Fish, при сравнении ОИЛ с клетками 1301. Данные, использованные для построения графиков, представлены в табличном формате (Таблица 25) в приложении 10. В целом, имело место примерное сходство паттернов результатов двух анализов для измерения теломер, однако эксперименты будут продолжены для определения того, какой способ позволяет более точно определять истинную длину теломер в ОИЛ. Этот метод будет использован для будущих клинических образцов с целью определения взаимосвязи между длиной теломер и ответом пациентов на терапию при помощи ОИЛ.

[00178] **Фигура 62A-62B:** Выбор поставщика бессывороточной среды (заменитель сыворотки). Каждый фрагмент культивировали в одиночной лунке 24-луночного планшета G-Rex в четырех повторах. В день 11 начинали ПБР с использованием 4^5 ОИЛ с 10^6 питающих клеток для имитации способа 2A. A) Гистограмма показывает среднее количество жизнеспособных клеток, определенное в день 11 (пре-ПБР) для каждого условия. B) Гистограмма, показывающая среднее количество жизнеспособных клеток, определенное в день 22 (пост-ПБР). P-значение рассчитывали с использованием критерия Стьюдента. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, соответственно.

[00179] **Фигура 63A-63B:** Выбор поставщика бессывороточной среды (сыворотка лизата тромбоцитов). Каждый фрагмент культивировали в одиночной лунке 24-луночного планшета G-Rex в трех повторах. В день 11 начинали ПБР с использованием 4e5 ОИЛ с 10e6 питающих клеток для имитации способа 2A. A) Гистограмма показывает среднее количество жизнеспособных клеток, определенное в день 11 (пре-ПБР) для каждого условия. B) Гистограмма, показывающая среднее количество жизнеспособных клеток, определенное в день 22 (пост-ПБР). P-значение рассчитывали с использованием критерия

Стьюдента. * P <0,05, ** P <0,01, *** P <0,001, соответственно. «#» недостаточно опухолевых фрагментов.

[00180] **Фигура 64A-64B:** Сравнение эффективности CTS Optimizer и стандартной среды с использованием мелкомасштабного способа 2A (G-Rex 5M). Два фрагмента/G-Rex 5M культивировали в трех повторах, ПБР начинали с использованием 2^6 ОИЛ и 50^6 питающих клеток для имитации способа 2A. Столбики показывают среднее количество жизнеспособных клеток, определенное в день 11 (A) или день 22 (B).

[00181] **Фигура 65A-65C:** Совокупность результатов до и после размножения ОИЛ, экстраполированных с целью сравнения стандартных условий и CTS Optimizer. A) Пре-ПБР. B) Пост-ПБР. C) Совокупность результатов размножения ОИЛ, экстраполированных на полномасштабный процесс (стандартные условия против CTS Optimizer+3C).

[00182] **Фигура 66:** Дискриминационное окно для CD8+ было установлено на живые клетки. В 7 из 9 опухолей было показано увеличение абсолютной популяции CD8+ клеток в условиях CTS+3C.

[00183] **Фигура 67:** Сравнение продуцирования интерферона-гамма. ELISA для интерферона-гамма (Quantikine). Продуцирование IFN-γ измеряли с использованием набора Quantikine ELISA от компании R&D systems. При использовании CTS+3C были получены сопоставимые результаты для продуцирования IFN-γ при сравнении со стандартными условиями, используемыми авторами изобретения.

[00184] **Фигура 68:** 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 OKT3 для размножения в ПБР в течение дополнительных 11 дней.

[00185] **Фигура 69A-69B:** ОИЛ, полученные из меланомы (n=4) и опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически, на CD4+ и CD8+ клетки с использованием метода проточной цитометрии после пре-ПБР. *P-значения представляют разницу между применением IL-2 и IL-12/IL-15/IL-21 в CD8+ клетках, определенную с использованием непарного критерия Стьюдента.

[00186] **Фигура 70A-70B:** ОИЛ, полученные из меланомы (n=4) и опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически на CD27+ и CD28+ в CD4+ и CD8+ клетках с использованием метода проточной цитометрии после пре-ПБР.

[00187] **Фигура 71A-71C:** ОИЛ оценивали фенотипически на подгруппы эффекторных клеток/клеток памяти (CD45RA и CCR7) в CD8+ и CD4+ клетках (данные не представлены) в меланоме (n=4) (A) и опухоли легкого (n=8) (B). Экспрессию CXCR3 оценивали в меланоме и опухоли легкого. Всю фенотипическую экспрессию оценивали с использованием метода проточной цитометрии после пре-ПБР. TCM=центральные клетки памяти, TSCM=стволовые клетки памяти, TEMRA (эффекторные Т-клетки),

TEM=эффекторные клетки памяти.

[00188] **Фигура 72A-72C:** ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=5), оценивали на экспрессию CD107a+ в ответ на стимуляцию PMA в течение 4 часов в CD4+ и CD8+ клетках методом проточной цитометрии. (C) Пре-ПБР ОИЛ (n=5) стимулировали в течение 24 часов растворимым OKT3 (30 нг/мл) и оценивали супернатанты на продуцирование IFNγ методом ELISA.

[00189] **Фигура 73A-73B:** Репертуар TCRvβ (24 специфичности) оценивали в ОИЛ, полученных из меланомы (A) и опухоли легкого (B), с использованием набора Beckman Coulter для проточной цитометрии.

[00190] **Фигура 74:** Иллюстративный процесс производства криоконсервированных ОИЛ (~22 дня).

[00191] **Фигура 75A-75B:** В день 22 уменьшенный в объеме клеточный препарат объединяют и отбирают образец для определения состояния культуры перед промыванием и формулированием. Образцы анализируют на автоматическом счетчике клеток NC-200, как описано ранее. Общую плотность жизнеспособных клеток определяют путем подсчета общего среднего значения для полученных в двух повторах результатов для 4 независимых образцов. Способ 2 поколения (Gen 2) приводит к выходу препарата ОИЛ в дозе, аналогичной таковой при использовании способа поколения 1 (Gen 1; Gen 1 среднее=$4{,}10\times10^{10} \pm 2{,}92\times10^{10}$, Gen 2 среднее=$3{,}12\times10^{10} \pm 2{,}19\times10^{10}$). B) Рассчитывают кратность увеличения количества для фазы ПБР как результат деления конечной плотности жизнеспособных клеток на начальную плотность жизнеспособных затравочных ОИЛ. Препараты ОИЛ Gen 2 имеют более низкую кратность увеличения количества в сравнении с Gen 1 (Gen 1 среднее =$1{,}40\times10^{3} \pm 9{,}86\times10^{2}$, Gen 2 среднее=$5{,}11\times10^{2} \pm 2{,}95\times10^{2}$).

[00192] **Фигура 76:** Свежие сформулированные препараты лекарственного средства анализировали на идентификационные характеристики методом проточной цитометрии для выпуска. Способы Gen 1 и Gen 2 приводили к получению высокочистых Т-клеточных культур при определении на основании CD45, CD3 двойного положительного фенотипа (Gen 1 # ± SD, Gen 2 # ± SD). P-значение рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[00193] **Фигура 77A-77B:** Криоконсервированные сателлитные флаконы со сформулированным препаратом лекарственного средства размораживали и анализировали на расширенный фенотип методом проточной цитометрии, как описано ранее. Gen 1 и Gen 2 препараты имели сходное соотношение CD8 и CD4 подтипов Т-клеток. P-значение рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[00194] **Фигура 78A-78B:** Криоконсервированные сателлитные флаконы со сформулированным препаратом лекарственного средства размораживали и анализировали на расширенный фенотип методом проточной цитометрии, как описано ранее. Gen 1 и Gen 2 препараты имели сходные уровни костимулирующих молекул CD27 и CD28 на подгруппах Т-клеток. P-значение рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

Костимулирующие молекулы, такие как CD27 и CD28, необходимы для обеспечения вторичной и третичной сигнализации, необходимой для пролиферации эффекторных клеток при связывании с Т-клеточным рецептором.

[00195] **Фигура 79:** Технологию Flow-FISH использовали для измерения средней длины теломерных повторов, как описано ранее. Значение ОДТ свидетельствует о том, что средняя интенсивность флуоресценции теломер на хромосому/геном в Gen 1 (вариант осуществления способа 1C) составляет #% ± SD%, и в Gen 2 составляет #% ± SD% от интенсивности флуоресценции теломер на хромосому/геном в контрольной клеточной линии (клеточная линия лейкоза 1301). Данные свидетельствуют о том, что Gen 2 препараты в среднем имеют по меньшей мере сопоставимые длины теломер с Gen 1 препаратами. Длина теломер является суррогатной мерой продолжительности культивирования клеток ex vivo.

[00196] **Фигура 80:** Gen 2 (вариант осуществления способа 2A) препараты лекарственного средства проявляют повышенную способность к продуцированию IFN-γ относительно Gen 1 препаратов лекарственного средства. Способность препарата лекарственного средства быть реактивированным и секретировать цитокин является суррогатной мерой in vivo функции при связывании TCR с соответствующим антигеном в контексте HLA.

[00197] **Фигура 81A-81B:** Разнообразие Т-клеточных рецепторов: РНК из $10x10^6$ ОИЛ из Gen 1 (вариант осуществления способа 1C) и Gen 2 (вариант осуществления способа 2A) препаратов лекарственного средства анализировали для определения общего количества и частоты встречаемости уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в каждом препарате. A) Общее количество уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в каждом препарате (Gen 1 n=#, среднее ± SD, Gen 2 n =#, среднее ± SD). B) Уникальные последовательности CDR3 были индексированы относительно частоты в каждом препарате для получения балльного показателя, репрезентативного для общего разнообразия Т-клеточных рецепторов в препарате. Препараты ОИЛ, полученные обоими способами, состояли из поликлональных популяций Т-клеток с разной антигенной специфичностью и авидностью. Ширина общего Т-клеточного репертуара может быть показателем числа эпитопов на клетках опухолей, которые могут быть использованы.

[00198] **Фигура 82:** Показана диаграмма варианта осуществления способа 2A, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00199] **Фигура 83:** Сравнительная таблица этапов A-F из иллюстративных вариантов осуществления способа 1C и способа 2A.

[00200] **Фигура 84:** Подробное сравнение варианта осуществления способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

[00201] **Фигура 85:** Подробная схема варианта осуществления способа ОИЛ-терапии.

[00202] **Фигуры 86A-86C**: Фенотипические характеристики препаратов ОИЛ с

использованием 10-цветного проточно-цитометрического анализа. (A) Процентную долю подгрупп Т-клеток и не Т-клеток определяли на основании $CD45^+CD3^+$ и CD45-(не лимфоцит)/$CD45^+CD3^-$ (не Т-клеточный лимфоцит), соответственно. В целом, >99% в протестированных препаратах ОИЛ составляли Т-клетки ($CD45^+CD3^+$). Показаны средние значения для препаратов ОИЛ (n=10). (B) Процентная доля двух подгрупп Т-клеток, включающих $CD45^+CD3^+CD8^+$ (синие незаштрихованные кружки) и $CD45^+CD3^+CD4^+$ (розовые незаштрихованные кружки). Статистически значимая разница в процентных долях обеих подгрупп отсутствовала при анализе с использованием непарного критерия Стьюдента (P=0,68). (C) Не Т-клеточная популяция была охарактеризована в отношении четырех разных подгрупп, включая: 1) не лимфоциты ($CD45^-$), 2) NK-клетки ($CD45^+CD3^-CD16^+/56^+$), 3) B-клетки ($CD45^+CD19^+$) и 4) не NK/B-клетки ($CD45^+CD3^-CD16^-CD56^-CD19^-$).

[00203] **Фигуры 87A-87B**: Характеристики подгрупп Т-клеток в CD45+CD3+CD4+ и CD45+CD3+CD8+ клеточных популяциях. Подгруппы Т-клеток, включая необученные клетки, центральные клетки памяти (TCM), эффекторные клетки памяти (TEF) и эффекторные RA+(EMRA) клетки памяти, определяли на основании CD45RA и CCR7. Фигуры показывают репрезентативные подгруппы Т-клеток из 10 конечных препаратов ОИЛ как в CD4+ (A), так и в CD8+ (B) клеточных популяциях. Подгруппа эффекторных Т-клеток памяти (синие незаштрихованные кружки) является основной популяцией (>93%) и в CD4+, и в CD8+ подгруппах ОИЛ конечного препарата. Менее 7% клеток препаратов ОИЛ относятся к подгруппе центральных клеток памяти (розовые незаштрихованные кружки). Подгруппы EMRA (серые незаштрихованные кружки) и необученных (черные незаштрихованные кружки) клеток едва поддаются определению в препарате ОИЛ (<0,02%). P-значения представляют разницу между EM и CM, определенную с использованием непарного критерия Стьюдента.

[00204] **Фигуры 88A-88B:** Определение экспрессии MCSP и EpCAM в опухолевых клетках меланомы. Опухолевые линии клеток меланомы (WM35, 526 и 888), линии клеток меланомы, полученные от пациентов (1028, 1032 и 1041), и линию клеток колоректальной аденокарциномы (HT29 в качестве отрицательного контроля) характеризовали путем окрашивания на маркеры MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан) и EpCAM (молекула клеточной адгезии эпителия). (A) В среднем, 90% опухолевых клеток меланомы экспрессируют MCSP. (B) Экспрессия EpCAM не была обнаружена в опухолевых линиях клеток меланомы при сравнении с положительным контролем HT29, EpCAM+ опухолевой линией клеток.

[00205] **Фигуры 89A-89B**: Анализ контролей с добавленными клетками для определения точности обнаружения опухолей. Анализ проводили путем добавления известного количества опухолевых клеток в суспензию МКПК (n=10). MCSP+526 опухолевые клетки меланомы разбавляли в пропорциях 1:10, 1:100 и 1:1000, затем смешивали с МКПК и окрашивали анти-MCSP и анти-CD45 антителами и красителем для определения живых/мертвых клеток, и анализировали методом проточной цитометрии.

(A) Было обнаружено примерно 3000, 300 и 30 клеток при разведении 1:10, 1:100 и 1:1000, соответственно. (B) Среднее значение (Среднее) и стандартное отклонение (SD) для клеток в каждом случае использовали для определения верхних и нижних эталонных пределов.

[00206] **Фигуры 90A-90B:** Исследование воспроизводимости результатов для верхних и нижних пределов в контролях с добавленными клетками. Проводили три независимых эксперимента в трех повторах для определения воспроизводимости анализа с добавлением клеток. (A) Количества обнаруженных $MCSP^+$ опухолевых клеток были постоянными в диапазоне верхних и нижних эталонных пределов. (B) График линейной регрессии демонстрирует корреляцию между $MCSP^+$ клетками и разбавлениями при добавлении клеток (R^2=0,99), при этом сплошная черная линия показывает наилучшее соответствие. Зеленые и серые прерывистые линии представляют 95% пределы предсказания в стандартной кривой и образцах (эксперименты № 1-3), соответственно.

[00207] **Фигуры 91A-91B:** Обнаружение остаточной опухоли меланомы в препаратах ОИЛ. Препараты ОИЛ оценивали на остаточные примеси опухоли с использованием разработанного анализа (n=15). (A и B) Среднее количество и процентная доля поддающихся обнаружению событий MCSP+ составляли 2 и 0,0002%, соответственно.

[00208] **Фигура 92:** Оценка активности препаратов ОИЛ после активации Т-клеток. Секрецию IFNγ после рестимуляции анти-CD3/CD28/CD137 в препаратах ОИЛ оценивали методом ELISA в двух повторах (n=5). Секреция IFNγ в препаратах ОИЛ была значительно выше, чем в не стимулированных контролях, при анализе с использованием критерия знаковых рангов Вилкоксона (P=0,02), и постоянно на уровне >1000 пг/мл. Секрецию IFNγ на уровне >200 пг/мл считают эффективной. P-значение <0,05 считается статистически значимым.

[00209] **Фигура 93**: Схема варианта осуществления процесса производства криоконсервированных ОИЛ (22 дня).

[00210] **Фигура 94**: Таблица усовершенствований способа от Gen 1 до Gen 2.

[00211] **Фигуры 95A-95C:** Общее количество жизнеспособных клеток, скорость роста и жизнеспособность. В день 22 уменьшенный в объеме клеточный препарат объединяют и отбирают образец для определения состояния культуры перед промыванием и формулированием. Образцы анализируют на автоматическом счетчике клеток NC-200, как описано ранее. Общую плотность жизнеспособных клеток определяют путем подсчета общего среднего значения для полученных в двух повторах результатов для 4 независимых образцов. Способ Gen 2 приводит к выходу препарата ОИЛ в дозе, аналогичной таковой при использовании способа Gen 1 (Gen 1 среднее=$4{,}10\times10^{10} \pm 2{,}8\times10^{10}$, Gen 2 среднее=$4{,}12\times10^{10} \pm 2{,}5\times10^{10}$). (B) Скорость роста рассчитывают для фазы ПБР по формуле $gr=\ln(N(t)/N(0))/t$. (C) Жизнеспособность клеток оценивали для 9 лотов, используемых для разработки процесса, при помощи Cellometer K2, как описано ранее. Существенное уменьшение жизнеспособности клеток отсутствовало после одного цикла

замораживания-размораживания сформулированного препарата. Среднее уменьшение жизнеспособности при размораживании и отборе образца составляло 2,19%.

[00212] **Фигуры 96A-96C:** Препараты, полученные способом Gen 2, представляют собой высокочистые культуры Т-клеток, экспрессирующих костимулирующие молекулы на уровнях, сопоставимых с уровнями в Gen 1. (A) Свежие сформулированные препараты лекарственного средства анализировали на идентификационные характеристики методом проточной цитометрии для выпуска. Способы Gen 1 и Gen 2 приводили к получению высокочистых Т-клеточных культур при определении на основании CD45+CD3+ (дважды положительного) фенотипа. (B & C) Криоконсервированные сателлитные флаконы со сформулированным препаратом лекарственного средства размораживали и анализировали на расширенный фенотип методом проточной цитометрии, как описано ранее. Препараты, полученные способами Gen 1 и Gen 2, имели сходные уровни экспрессии костимулирующих молекул CD27 и CD28 в подгруппах Т-клеток. Костимулирующие молекулы, такие как CD27 и CD28, необходимы для обеспечения вторичной и третичной сигнализации, необходимой для пролиферации эффекторных клеток при связывании с Т-клеточным рецептором. P-значение рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[00213] **Фигура 97:** Полученные способом Gen 2 препараты имели сходную длину теломер. Однако некоторые популяции ОИЛ могут иметь тенденцию к относительному удлинению теломер.

[00214] **Фигура 98:** Полученные способом Gen 2 препараты лекарственного средства секретируют IFNγ в ответ на связывание CD3, CD28 и CD137.

[00215] **Фигуры 99A-99B:** Разнообразие Т-клеточных рецепторов. (A) Уникальные последовательности CDR3 были индексированы относительно частоты в каждом препарате для получения балльного показателя, репрезентативного для общего разнообразия Т-клеточных рецепторов в препарате. (B) Среднее общее число уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в каждом инфузионном препарате.

[00216] **Фигура 100:** Вариант осуществления способа производства ОИЛ по настоящему изобретению.

[00217] **Фигура 101:** Увеличение размножения в процессе пре-ПБР с IL-2/IL-15/IL-21 для различных гистологических видов опухолей.

[00218] **Фигуры 102A-102B:** Смесь IL-2/IL-15/IL-21 приводила к увеличению процентной доли CD8+ клеток в случае карциномы легкого, но не меланомы. ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически на CD4+ и CD8+ клетки методом проточной цитометрии после пре-ПБР.

[00219] **Фигуры 103A-103B:** Экспрессия CD27 была немного повышена в CD8+ клетках в культурах, обработанных IL-2/IL-15/IL-21. ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически на CD27+ и CD28+ в CD4+ и CD8+ клетках методом проточной цитометрии после пре-ПБР.

[00220] **Фигуры 104A-104B:** Подгруппы Т-клеток оставались неизменными при

добавлении IL-15/IL-21. ОИЛ оценивали фенотипически на подгруппы эффекторных клеток/клеток памяти (CD45RA и CCR7) в CD8+ и CD4+ (данные не представлены) клетках из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=8) методом проточной цитометрии после пре-ПБР.

[00221] **Фигуры 105A-105C:** Функциональная способность ОИЛ дифференциально возрастала при добавлении IL-2/IL-15/IL-21. ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=5), оценивали на экспрессию CD107a+ в ответ на стимуляцию PMA в течение 4 часов в CD4+ и CD8+ клетках методом проточной цитометрии. (C) Пре-ПБР ОИЛ, полученные из меланомы и опухоли легкого, стимулировали в течение 24 часов растворимым анти-CD3 антителом, и супернатанты оценивали на продуцирование IFNγ методом ELISA.

[00222] **Фигуры 106A-106B:** Репертуар TCRvβ (24 специфичности) оценивали в ОИЛ, полученных из (A) меланомы и (B) опухоли легкого, с использованием набора Beckman Coulter для проточной цитометрии.

[00223] **Фигура 107:** Схема способа Gen 2 производства криоконсервированных LN-144.

[00224] **Фигура 108:** Схема, иллюстрирующая дизайн многоцентрового фазы 2 клинического исследования с введением новых криоконсервированных ОИЛ пациентам с метастатической меланомой.

[00225] **Фигура 109:** Таблица, иллюстрирующая сравнение характеристик пациентов группы 1 (ASCO 2017) с пациентами группы 2.

[00226] **Фигура 110:** Таблица, иллюстрирующая нежелательные явления, возникающие в ходе лечения (≥30%).

[00227] **Фигура 111:** Эффективность инфузионного препарата и ОИЛ-терапии.

[00228] **Фигура 112:** Клинический статус подходящих для оценки ответа пациентов с C3 или лучшим ответом.

[00229] **Фигура 113:** Изменение, в процентах, суммы диаметров опухоли.

[00230] **Фигура 114:** Увеличение уровня HMGB1 наблюдали при лечении ОИЛ.

[00231] **Фигура 115:** Увеличение содержания биомаркера IL-10 наблюдали после инфузии LN-144.

[00232] **Фигура 116:** Обновленные характеристики пациентов с метастатической меланомой из группы 2 клинического исследования фазы 2 после второго прекращения сбора данных (N=17 пациентов).

[00233] **Фигура 117:** Нежелательные явления, возникающие в ходе лечения, для группы 2 (≥30%) после второго прекращения сбора данных (N=17 пациентов).

[00234] **Фигура 118:** Время до развития ответа у подходящих для оценки пациентов (стабильное заболевание или лучше) в группе 2 после второго прекращения сбора данных (N=17 пациентов). Из 10 пациентов в группе для оценки эффективности, один пациент (Пациент 10) был неподходящим для оценки вследствие вызванной меланомой смерти до проведения первой оценки опухолей, без представления на фигуре.

[00235] **Фигура 119:** Обновленные данные по эффективности для группы 2 после второго прекращения сбора данных (N=17 пациентов). Среднее количество введенных инфузией ОИЛ составляло 34×10^9. Среднее число получаемых ранее курсов терапии составляло 4,5. Пациенты с мутацией BRAF отвечали на лечение, как и пациенты с BRAF дикого типа (* относится к пациентам с мутацией BRAF). Один пациент (Пациент 10) был неподходящим для оценки вследствие вызванной меланомой смерти до проведения первой оценки опухолей, но был проанализирован в группе определения эффективности. Сокращения: ЧО, частичный ответ; СЗ, стабильное заболевание; ПЗ, прогрессирующее заболевание.

[00236] **Фигура 120:** Обновленные данные по эффективности для подходящих для оценки пациентов из группы 2 после второго прекращения сбора данных (N=17 пациентов). * отмечен неподходящий для оценки пациент, не доживший до первой оценки. Подходящие для оценки в отношении эффективности пациенты ранее получали лечение ингибиторами иммунных контрольных точек анти-PD-1 и анти-CTLA-4.

[00237] **Фигура 121:** Репрезентативная компьютерная томограмма пациента (003-015) с ЧО из группы 2 после второго прекращения сбора данных.

[00238] **Фигура 122:** Корреляция индукции IFN-γ препаратом ОИЛ перед проведением инфузии с клиническим уменьшением размера опухоли в день 42 после инфузии ОИЛ.

[00239] **Фигура 123:** Уровни IP-10 (CXCL10) (пг/мл, $\log_{10}$) до и после инфузии препарата ОИЛ, полученного в соответствии с вариантом осуществления Gen 2. IP-10 является маркером клеточной адгезии и хоминга.

[00240] **Фигура 124:** Уровни IP-10 (CXCL10) (пг/мл, $\log_{10}$) до и после инфузии препарата ОИЛ, полученного в соответствии с вариантом осуществления Gen 1.

[00241] **Фигура 125:** Уровни MCP-1 (пг/мл, $\log_{10}$) до и после инфузии препарата ОИЛ, полученного в соответствии с вариантом осуществления Gen 2. MCP-1 является маркером клеточной адгезии и хоминга.

[00242] **Фигура 126:** Уровни MCP-1 (пг/мл, $\log_{10}$) до и после инфузии препарата ОИЛ, полученного в соответствии с вариантом осуществления Gen 1.

[00243] **Фигура 127:** Данные исследований фазы 2 для пациентов с карциномой шейки матки и плоскоклеточной карциномой головы и шеи (ПКГШ). СЗ=стабильное заболевание. РЗ=прогрессирующее заболевание. ЧО=частичный ответ.

[00244] **Фигура 128:** Представлена диаграмма варианта осуществления способа 2A, 22-дневного процесса производства ОИЛ.

[00245] **Фигура 129:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) упаковки для переноса суспензии ОИЛ с нижней частью (одна линия) гравитационного фильтра для крови. **Фигура 130:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) красной линии для удаления среды от G-Rex 100 MCS к пакету для переноса «супернатант». **Фигура 131:** Показано схематическое изображение

сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) 4S-4M60 с CC2 Cell Connect, заменяющего одну иглу прибора Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G).

[00246] **Фигура 132:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) набора для переливания плазмы с одним из конусов Люэра в 4S-4M60.

[00247] **Фигура 133:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) длинного конца гравитационного фильтра для крови с исходным мешком LOVO.

[00248] **Фигура 134:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) одной из двух исходных линий фильтра с собирающим мешком «объединенная суспензия ОИЛ».

[00249] **Фигура 135:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) а 4S-4M60 с CC2 Cell Connect, заменяющего одну иглу прибора Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G).

[00250] **Фигура 136:** Показано схематическое изображение стерильного сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) криомешков CS750 с конструкцией, созданной на этапе 8.14.8, заменяющего каждый из четырех конусов Люэра (E) на каждый мешок.

[00251] **Фигура 137:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) мешков CS-10 с иглами 4S-4M60.

[00252] **Фигура 138:** Показано схематическое изображение сварного соединения (смотри, примечание 5.11 в примере 30) мешка «сформулированные ОИЛ» с оставшейся иглой (A) на устройстве, созданном на этапе 8.14.10.

[00253] **Фигура 139**: Показана схема термосварки (смотри, примечание 5.12 в примере 30) в F, приводящей к удалению пустого мешка ретентата и мешков CS-10.

[00254] **Фигура 140**: Показаны структуры I-A и I-B, цилиндры соответствуют отдельным полипептидным связывающим доменам. Структуры I-A и I-B включают три линейно связанных TNFRSF-связывающих домена, полученных из, например, 4-1BBL или антитела, связывающего 4-1BB, которые сворачиваются, с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком через IgG1-Fc (включающий домены C_H3 и C_H2), который затем используют для связывания двух трехвалентных белков дисульфидными связями (небольшие вытянутые овалы), стабилизируя структуру и образуя агонисты, способные объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальные белки, с образованием сигнального комплекса.

[00255] **Фигура 141**: Показана диаграмма, показывающая обзор трех фаз эксперимента, описанного в примере 21.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00256] SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи муромонаба.

[00257] SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи муромонаба.

[00258] SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-2.

[00259] SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

[00260] SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-4.

[00261] SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-7.

[00262] SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-15.

[00263] SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность рекомбинантного человеческого белка IL-21.

[00264] SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность человеческого 4-1BB.

[00265] SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность мышиного 4-1BB.

[00266] SEQ ID NO: 11 представляет собой тяжелую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00267] SEQ ID NO: 12 представляет собой легкую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00268] SEQ ID NO: 13 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00269] SEQ ID NO: 14 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00270] SEQ ID NO: 15 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00271] SEQ ID NO: 16 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00272] SEQ ID NO: 17 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00273] SEQ ID NO: 18 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00274] SEQ ID NO: 19 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00275] SEQ ID NO: 20 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела утомилумаба (PF-05082566).

[00276] SEQ ID NO: 21 представляет собой тяжелую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00277] SEQ ID NO: 22 представляет собой легкую цепь агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00278] SEQ ID NO: 23 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00279] SEQ ID NO: 24 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00280] SEQ ID NO: 25 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00281] SEQ ID NO: 26 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00282] SEQ ID NO: 27 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00283] SEQ ID NO: 28 представляет собой CDR1 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00284] SEQ ID NO: 29 представляет собой CDR2 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00285] SEQ ID NO: 30 представляет собой CDR3 легкой цепи агониста 4-1BB, моноклонального антитела урелумаба (BMS-663513).

[00286] SEQ ID NO: 46 представляет собой аминокислотную последовательность лиганда 4-1BB (4-1BBL).

[00287] SEQ ID NO: 47 представляет собой растворимый фрагмент полипептида 4-1BBL.

[00288] SEQ ID NO: 48 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 1.

[00289] SEQ ID NO: 49 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 1.

[00290] SEQ ID NO: 50 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 2.

[00291] SEQ ID NO: 51 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела 4B4-1-1, варианта 2.

[00292] SEQ ID NO: 52 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агониста 4-1BB, антитела H39E3-2.

[00293] SEQ ID NO: 53 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агониста 4-1BB, антитела H39E3-2.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Введение

[00294] 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.

[00295] 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 биоэнергетичеких субстратов, необходимых им для пролиферации, миграции, активации и противоопухолевой активности.

[00296] В предыдущих публикациях сообщалось, что ограничение гликолиза и стимуляция митохондриального метаболизма в ОИЛ перед переносом являются желательными, поскольку клетки, сильно зависящие от гликолиза, будут страдать от депривации питательных веществ при адоптивном переносе, что приводит к гибели большинства перенесенных клеток. Таким образом, в данной области принято считать, что стимуляция митохондриального метаболизма может способствовать долговечности in vivo, и фактически предполагается использование ингибиторов гликолиза перед индукцией иммунного ответа. Смотри Chang et al. (Chang, et al., Nat. Immunol. **2016,** 17(364).

[00297] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам оценки и количественного определения этого улучшения метаболического здоровья. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам анализа относительного здоровья популяции ОИЛ с использованием одной или более общих оценок метаболизма, включая, но без ограничения, скорости и количественные показатели гликолиза, окислительного фосфорилирования, запасной дыхательной емкости (SRC) и гликолитического резерва.

[00298] Кроме того, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к способам оценки и количественного определения этого улучшения метаболического здоровья. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам анализа относительного здоровья популяции ОИЛ с использованием одной или более общих оценок метаболизма, включая, но без ограничения, скорости и количественные показатели гликолиза, окислительного фосфорилирования, запасной дыхательной емкости (SRC) и гликолитического резерва.

[00299] Кроме того, необязательные дополнительные оценки включают, но без ограничения, оценку продуцирования АТФ, митохондриальной массы и поглощения

глюкозы.

II. Определения

[00300] 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.

[00301] Термин «in vivo» относится к событию, которое имеет место в организме субъекта.

[00302] 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.

[00303] 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.

[00304] 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.

[00305] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты», или «ОИЛ», означает популяцию клеток, исходно полученную в виде белых клеток крови, которые покидают кровоток 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 М1 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.

[00306] 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 IL-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 $1,5\times10^9$ до $1,5\times10^{10}$ клеток для инфузии.

[00307] 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.

[00308] 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.

[00309] 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 αβ, 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.

[00310] 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. Среду CS10 можно называть торговым названием «CryoStor® CS10». Среда CS10 представляет собой бессывороточную, не содержащую животные компоненты среду, которая содержит ДМСО.

[00311] 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 секретируют 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.

[00312] 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 секретируют 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.

[00313] 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.

[00314] 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.

[00315] Термины «мононуклеарные клетки периферической крови» и «МКПК» означают клетки периферической крови, имеющие круглое ядро, включая лимфоциты (такие как Т-клетки, В-клетки и NK клетки) и моноциты. Предпочтительно, мононуклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови. МКПК представляют собой разновидность антигенпредставляющих клеток.

[00316] Термин «анти-CD3 антитело» означает антитело, или его вариант, например, моноклональное антитело, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Анти-CD3 антитела включают OKT-3, также известное как муромонаб. Анти-CD3 антитела также включают клон UHCT1, также известный как T3 и CD3ε. Другие анти-CD3 антитела включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и висилизумаб.

[00317] Термин «OKT-3» (другое название в настоящем документе «OKT3») относится к моноклональному антителу, или его биологическому аналогу или варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, которое

направлено против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и охватывает коммерчески доступные формы, такие как OKT-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 биологические аналоги. Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей муромонаба приведены в Таблице 1 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2). Гибридома, способная продуцировать OKT-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур и имеет регистрационный номер ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать OKT-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 TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 2 (Муромонаб легкая цепь)	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00318] 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, биологические аналоги и варианты. IL-2 описан, например, в публикациях Nelson, J. Immunol. **2004,** 172, 3983-88 и Malek, Annu. Rev. Immunol. **2008,** 26, 453-79, 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-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO: 4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET

	TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 5 рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 6 рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTOИЛ LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO: 7 рекомбинантный человеческий IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL 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 KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

[00319] 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 MHC 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 CTP0043). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-4, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 5).

[00320] 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 PHC0071). Аминокислотная последовательность рекомбинантного человеческого IL-7, подходящего для использования по изобретению, приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO: 6).

[00321] 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, биологические аналоги 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).

[00322] Термин «IL-21» (другое название в настоящем документе «IL21») означает белок плейотропного цитокина, известный как интерлейкин-21, и охватывает все формы IL-21, включая его формы у человека и млекопитающих с консервативными аминокислотными заменами, гликоформы, биологические аналоги 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).

[00323] 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 от 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.

[00324] 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.

[00325] 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.

[00326] 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).

[00327] Используемый в настоящем документе термин «микросреда» может относится 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 матриксов 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.

[00328] 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 циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение 2 дней (дни 27 и 26 до инфузии ОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м^2/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.

[00329] 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.

[00330] 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.

[00331] 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.

[00332] 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: (a) 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.

[00333] 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).

[00334] 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.

[00335] 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.

[00336] Используемый в настоящем документе термин «опухоль-инфильтрирующие лимфоциты», или «ОИЛ», означает популяцию клеток, исходно полученную в виде белых клеток крови, которые покидают кровоток 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 М1 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 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ).

[00337] 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 αβ, 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.

[00338] 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.

[00339] 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.

[00340] 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».

Агонисты 4-1BB (CD137)

[0001] 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 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления агонисты 4-1BB для использования в описанных в настоящем документе способах и композициях включают анти-4-1BB антитела, человеческие анти-4-1BB антитела, мышиные анти-4-1BB антитела, анти-4-1BB антитела млекопитающих, моноклональные анти-4-1BB антитела, поликлональные анти-4-1BB антитела, химерные анти-4-1BB антитела, анти-4-1BB аднектины, анти-4-1BB доменные антитела, анти-4-1BB одноцепочечные фрагменты, анти-4-1BB фрагменты тяжелой цепи, анти-4-1BB фрагменты легкой цепи, анти-4-1BB слитые белки, а также их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоэквиваленты. Известно, что агонистические анти-4-1BB антитела индуцируют сильные иммунные ответы. Lee, et al., PLOS One **2013**, 8, e69677. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое анти-4-1BB гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (то есть, антитело, происходящее из клеток одной линии). В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб, либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб или урелумаб, либо его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоэквивалент.

[0002] В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB, или 4-1BB-

связывающая молекула, также может представлять собой слитый белок. В предпочтительном варианте осуществления мультимерный агонист 4-1BB, например, трехмерный или гексамерный агонист 4-1BB (с тремя или шестью лиганд-связывающими доменами), может индуцировать превосходную кластеризацию рецепторов (4-1BBL) 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.

[0003] Известно, что агонистические анти-4-1BB антитела и слитые белки индуцируют сильные иммунные ответы. В предпочтительном варианте осуществления агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело, или слитый белок, которое связывает специфически антиген 4-1BB в достаточной степени для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое анти-4-1BB моноклональное антитело, или слитый белок, которое устраняет антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC), например, NK-клеточную цитотоксичность. В некоторых вариантах осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистическое анти-4-1BB 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.

[0004] 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 мышиный 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,	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60

Суперсемейства рецепторов фактор некроза опухолей, представитель 9 (Homo sapiens)	TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO: 10 мышиный 4-1BB, Суперсемейства рецепторов фактор некроза опухолей, представитель 9 (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TΦSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[0005] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 100 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 90 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 80 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 70 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 60 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 50 пМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 40 пМ или ниже, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной K_D примерно 30 пМ или ниже.

[0006] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно $7,5\times10^5$ 1/М·с или быстрее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно $7,5\times10^5$ 1/М·с или быстрее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно 8×10^5 1/М·с или быстрее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно $8,5\times10^5$ 1/М·с или быстрее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно 9×10^5 1/М·с или быстрее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно $9,5\times10^5$ 1/М·с или быстрее, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{assoc} примерно 1×10^6 1/М·с или быстрее.

[0007] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и

способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно 2×10^{-5} 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,1\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,2\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,3\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,4\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,5\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,6\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,7\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,8\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно $2,9\times10^{-5}$ 1/с или медленнее, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной k_{dissoc} примерно 3×10^{-5} 1/с или медленнее.

[0008] В некоторых вариантах осуществления описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 10 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 9 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 8 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 7 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 6 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 5 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 4 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 3 нМ или ниже, связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 2 нМ или ниже, или связывает человеческий или мышиный 4-1BB с величиной IC_{50} примерно 1 нМ или ниже.

[0009] 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 ILA, 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.

[0010] 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.

[0011] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелой и легкой цепей утомилумаба. В одном из вариантов осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, и вариабельная 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.

[0012] 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.

[0013] 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 IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPPV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP ПMLDSDGSFF 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 вариабельная область тяжелой цепи утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO: 14 вариабельная 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 тяжелой цепи утомилумаба	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
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

[0014] 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.

[0015] 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.

[0016] 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.

[0017] 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.

[0018] 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 4-1BB, относящиеся к урелумабу

Название	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO: 21 тяжелая цепь урелумаба	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAПKRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPПБPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO: 22 легкая цепь урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120

	PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO: 23 вариабельная область тяжелой цепи урелумаба	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO: 24 вариабельная область легкой цепи урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO: 25 CDR1 тяжелой цепи урелумаба	GYYWS 5
SEQ ID NO: 26 CDR2 тяжелой цепи урелумаба	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO: 27 CDR3 тяжелой цепи урелумаба	DYGPGNYDWY 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

[0019] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB выбирают из группы, состоящей из 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (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-IgGl (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 3El), антител, описанных в патенте США № 6974863 (например, 53A2); антител, описанных в патенте США № 6210669 (например, 1D8, 3B8 или 3El), 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.

[0020] 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.

[0021] 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 (смотри Фигуру 140). 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 CH3 и CH2), 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 VH и VL, 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.

[0022] 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 EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPПБPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY 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:	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29

37 линкер	
SEQ ID NO: 38 линкер	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE 24
SEQ ID NO: 39 линкер	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE 23
SEQ ID NO: 40 линкер	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E 21
SEQ ID NO: 41 линкер	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE 25

[0023] Аминокислотные последовательности других полипептидных доменов структуры I-B приведены в Таблице 7. Если Fc-фрагмент антитела слит с N-концом слитого белка для TNRFSF, 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 SED 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 GQPПБPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE 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

[0024] 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 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи урелумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи утомилумаба, вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи, выбранных из вариабельных областей тяжелых цепей и вариабельных областей легких цепей, описанных в Таблице 8, любого сочетания вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи вышеперечисленных, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоэквивалентов.

[0025] 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.

[0026] 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 VH и VL, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно, при этом домены VH и VL 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 VH и VL, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям, приведенным в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно, при этом домены VH и VL 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 VH и VL, которые по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям VH и VL, приведенным в Таблице 8, при этом домены VH и VL 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 MFAQLVAQNV 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 GLPSPRSE 168
SEQ ID NO: 48 вариабельная область тяжелой цепи 4B4-1-1 варианта 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTФ SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF 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 SCKASGYTФ SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO: 51 вариабельная область легкой	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG

цепь 4B4-1-1 варианта 2	GTKLEIKR 108
SEQ ID NO: 52 вариабельная область тяжелой цепи H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTФD 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

[0027] 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 4-1BB-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, при этом дополнительный домен представляет собой домен Fab или Fc-фрагмента, при этом каждый из растворимых 4-1BB-связывающих доменов лишен области стебля (которая участвует в образовании тримеров и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью 4-1BB-связывающего домена), и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[0028] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой агонистический для 4-1BB 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 4-1BB-связывающий домен.

[0029] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой

агонистическое для 4-1BB scFv антитело, содержащее любой из вышеуказанных доменов VH, связанный с любым из вышеуказанных доменов VL.

[0030] В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB от компании BPS Bioscience, каталожный № 79097-2, коммерчески доступное от компании BPS Bioscience, San Diego, CA, USA. В одном из вариантов осуществления агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB от компании Creative Biolabs, каталожный № MOM-18179, коммерчески доступное от компании Creative Biolabs, Shirley, NY, USA.

III. Способы производства ОИЛ

[00341] Иллюстративный способ получения ОИЛ, известный как способ 2A, включающий некоторые из этих признаков, представлен на Фигуре 1, и некоторые из преимуществ данного варианта осуществления настоящего изобретения над способом 1C описаны на Фигуре 2, а также Фигуре 84. Способ 1C показан для сравнения на Фигуре 3. Два альтернативных план-графика терапии при помощи ОИЛ на основе способа 2A показаны на Фигуре 4 (большее количество клеток) и Фигуре 5 (меньшее количество клеток). Вариант осуществления способа 2A показан на Фигуре 6, а также на Фигуре 27. На Фигурах 83 и 84 также представлен иллюстративный способ 2A в сравнении с иллюстративным способом 1C.

[00342] 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.

[00343] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ могут быть криоконсервированы. После размораживания они также могут быть рестимулированы для повышения их метаболизма перед инфузией пациенту.

[00344] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, называемые пре-ПБР, а также процессы, показанные на Фигуре 27 в качестве этапа A) сокращено до 3-14 дней, и второе размножение (включая процессы, называемые ПБР, а также процессы, показанные на Фигуре 27 в качестве этапа B) 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 B на Фигуре 27) сокращено до 11 дней, и второе размножение (например, размножение, описанное в качестве этапа D на Фигуре 27) сокращено до 11 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5 и 27. В некоторых вариантах осуществления сочетание первого размножения и второго размножения (например,

размножение, описанное в качестве этапа B и этапа D на Фигуре 27) сокращено до 22 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на фигурах.

[00345] Приведенные ниже обозначения «этапов» A, B, C и так далее, относятся к Фигуре 27 и относятся к конкретным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок этапов, описанных ниже и на Фигуре 27, 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.

A. Этап A: Получение образца опухоли пациента

[00346] 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.

[00347] 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.

[00348] 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.

[00349] 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.

[00350] После получения образец опухоли, как правило, фрагментируют с использованием острых инструментов на мелкие фрагменты размером от 1 до примерно 8 $мм^3$, особенно предпочтительно, размером примерно 2-3 $мм^3$. 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°С в атмосфере с 5% CO_2, 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 фиколла 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.

[00351] Как правило, собранную клеточную суспензию называют «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00352] 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.

[00353] В некоторых вариантах осуществления, если опухоль представляет собой солидную опухоль, опухоль подвергают физическому фрагментированию после того, как образец опухоли получен, например, на этапе А (как показано на Фигуре 27). 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.

[00354] 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 1-4 мм x 1-4 мм x 1-4 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер 1 мм x 1 мм x 1 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер 2 мм x 2 мм x 2 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер 3 мм x 3 мм x 3 мм. В некоторых вариантах осуществления опухоли имеют размер 4 мм x 4 мм x 4 мм.

[00355] 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.

[00356] 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 мМ 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% CO_2, а затем вновь механически фрагментировать в течение примерно 1 минуты. После инкубации в течение 30 минут при 37°C в атмосфере с 5% CO_2 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% CO_2. 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.

[00357] В некоторых вариантах осуществления собранную клеточную суспензию до проведения этапа первого размножения называют «первичной клеточной популяцией» или «свежесобранной» клеточной популяцией.

[00358] В некоторых вариантах осуществления клетки можно, необязательно, замораживать после сбора образца и хранить замороженными до введения их в размножение, описанное на этапе B, как более подробно описано ниже, а также на Фигуре 27.

B. Этап B: Первое размножение

1. Молодые ОИЛ

[00359] 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, at 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.

[00360] 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 27. 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 1C, представленным на Фигуре 83. 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 TCRab (то есть, TCR α/β).

[00361] После рассечения или расщепления опухолевых фрагментов, например, как описано на этапе A Фигуры 27, 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.

[00362] В предпочтительном варианте осуществления размножение ОИЛ можно проводить с использованием начального этапа размножения суммарных ОИЛ (например, как описано на этапе B Фигуры 27, 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.

[00363] 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 $мм^3$.

[00364] 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 Hepes 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 × 10^6 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% CO_2, 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.

[00365] После получения опухолевых фрагментов полученные клетки (то есть, фрагменты) 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 (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии клеточной популяции иАПК) с 6000 МЕ/мл IL-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 IL-2, или его вариант. В некоторых вариантах осуществления IL представляет собой рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет удельную активность 20-30×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет удельную активность 20×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет удельную активность 25×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет удельную активность 30×10^6 МЕ/мг на 1-мг флакон. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 4-8×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 5-7×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления маточный раствор IL-2 готовят, как описано в примере 4. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 10000 МЕ/мл IL-2, примерно 9000 МЕ/мл IL-2, примерно 8000 МЕ/мл IL-2, примерно 7000 МЕ/мл IL-2, примерно 6000

МЕ/мл IL-2 или примерно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 9000 МЕ/мл IL-2 до примерно 5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 8000 МЕ/мл IL-2 до примерно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит от примерно 7000 МЕ/мл IL-2 до примерно 6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого размножения, содержит примерно 6000 МЕ/мл IL-2. 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 дополнительно содержит IL-2. В предпочтительном варианте 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 примерно 8000 МЕ/мл IL-2.

[00366] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого 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 первого 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 первого 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 первого 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 первого 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.

[00367] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток, используемая для первого 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 первого 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 первого 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 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.

[00368] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела OKT-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 OKT-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 OKT-3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитело OKT-3.

[00369] 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.

[00370] 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 OKT-3 в начальной концентрации примерно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF включают агонист 4-1BB.

[00371] 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 Hepes 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 × 10^6 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% CO_2, 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.

[00372] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая, например, процессы, описанные на этапе В Фигуры 27, 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 27, 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 27. 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 B Фигуры 27.

[00373] 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 размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 3 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 4 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 5 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 6 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 7 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 8 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 9 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 10 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 11 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 12 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 13 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение 14 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 1 дня до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 2 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 3 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 4 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 5 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 6 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 7 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 8 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 9 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 10 дней до 11 дней. В некоторых вариантах осуществления

первое размножение ОИЛ можно проводить в течение 11 дней.

[00374] В некоторых вариантах осуществления используют сочетание IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 в виде комбинации в процессе первого размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любое их сочетание, можно включать во время первого размножения, в том числе, например, во время процессов этапа B на Фигуре 27, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления используют сочетание IL-2, IL-15 и IL-21 в виде комбинации в процессе первого размножения. В некоторых вариантах осуществления IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их сочетания, можно включать во время процессов этапа B на Фигуре 27, как описано в настоящем документе.

[00375] В некоторых вариантах осуществления первое размножение (включая процессы, называемые пре-ПБР; например, этап B на Фигуре 27) сокращено до 3-14 дней, как описано в примерах и на фигурах. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе B сокращено до 7-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления первое размножение на этапе B сокращено до 10-14 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5 и 27. В некоторых вариантах осуществления первое размножение сокращено до 11 дней, как описано в примерах и показано на Фигурах 4, 5 и 27.

[00376] В некоторых вариантах осуществления первое размножение, например, этап B на Фигуре 27, 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.

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

[00377] В некоторых случаях суммарную популяцию ОИЛ, полученную после первого размножения, включая, например, популяцию ОИЛ, полученную, например, на этапе B, как показано на Фигуре 27, 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.

[00378] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после первого

размножения (например, из этапа B, показанного на Фигуре 27), хранят до проведения фенотипирования для отбора. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные после первого размножения (например, из этапа B, показанного на Фигуре 27), 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.

[00379] 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, 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 1 дня до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления первое размножение ОИЛ можно проводить в течение срока от 2 дней до 14 дней. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 3 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 4 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 5 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 6 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 7 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 8 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит

через срок от 9 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 10 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 11 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 12 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 13 дней до 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через 14 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 1 дня до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 2 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 3 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 4 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 5 дней до 11 дней после фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению происходит через срок от 6 дней до 11 дней после 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.

[00380] 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 B к этапу D, как показано на Фигуре 27). 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.

[00381] В некоторых вариантах осуществления переход от первого размножения ко второму размножению, например, этап C на Фигуре 27, 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.

D. Этап D: Второе размножение

[00382] В некоторых вариантах осуществления количество клеток в популяции ОИЛ увеличивается после сбора и начальной массовой обработки, например, после этапа A и этапа B, а также перехода, называемого этапом C, как показано на Фигуре 27. 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 27). 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.

[00383] 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 27), 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.

[00384] 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 27). 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, OKT3, 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 А2 (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 L), или gpl 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.

[00385] 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.

[00386] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток содержит антитело OKT3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела OKT3. 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 OKT3. 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 OKT3. В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток не содержит антитело OKT-3.

[00387] 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.

[00388] 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 OKT-3 в начальной концентрации примерно 30 нг/мл, и при этом один или более агонистов TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB.

[00389] 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 27, 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 27, как описано в настоящем документе.

[00390] В некоторых вариантах осуществления второе размножение можно проводить в обогащенной среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, OKT-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, OKT-3 и антигенпредставляющие

питающие клетки. В некоторых вариантах осуществления вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-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, OKT-3 и антигенпредставляющие питающие клетки (то есть, антигенпредставляющие клетки).

[00391] 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.

[00392] 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.

[00393] 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.

[00394] 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 OKT3 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.

[00395] 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.

[00396] 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 $1x10^6$ 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% CO_2. 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 0,5-2,0x10^6 клеток/мл.

[00397] В одном из вариантов осуществления второе размножение (которое может включать размножение, называемое ПБР, а также то, которое описано на этапе D Фигуры 27) можно проводить в газопроницаемых флаконах емкостью 500 мл с 100-$см^2$ 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 (OKT-3). Флаконы G-Rex 100 можно инкубировать при 37°C в атмосфере с 5% CO_2. 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 засевания 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% CO_2, 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.

[00398] 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 OKT3 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.

[00399] 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 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, можно использовать для отбора ОИЛ на наличие превосходной реакционной способности в отношении опухоли.

[00400] **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.

[00401] 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 $1x10^6$ 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% CO_2. 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 $0,5\text{-}2,0x10^6$ клеток/мл.

[00402] В некоторых вариантах осуществления второе размножение (включая размножение, называемое ПБР) проводят во флаконах емкостью 500 мл с 100-$см^2$ газопроницаемым силиконовым дном (G-REX 100, Wilson Wolf) (Фиг. 1), примерно $5x10^6$ или $10x10^6$ 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% CO_2. 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 засевания 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% CO_2, 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.

[00403] 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 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 TCRab (то есть, TCR α/β).

[00404] 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, OKT-3, а также антигенпредставляющие питающие клетки (АПК), как описано более подробно ниже.

[00405] В некоторых вариантах осуществления второе размножение, например, этап D на Фигуре 27, 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.

1. Питающие клетки и антигенпредставляющие клетки

[00406] В одном из вариантов осуществления для процедуры второго размножения, описанной в настоящем документе (например, включая размножение, описанное на этапе D Фигуры 27, 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 мононуклеарные 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.

[00407] Как правило, аллогенные МКПК инактивируют, либо облучением, либо нагреванием, и используют в процедурах ПБР, как описано в примерах, в частности, примере 14, в котором приведен иллюстративный протокол для оценки неспособности к репликации облученных аллогенных МКПК.

[00408] 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). Смотри, например, пример 14.

[00409] 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 OKT3 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 OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2. Смотри, например, пример 13.

[00410] 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 OKT3 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 OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления МКПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах

осуществления МКПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2.

[00411] 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.

[00412] В одном из вариантов осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно $2,5x10^9$ питающих клеток к примерно $100x10^6$ ОИЛ. В другом варианте осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно $2,5x10^9$ питающих клеток к примерно $50x10^6$ ОИЛ. В другом варианте осуществления для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, необходимо соотношение, составляющее примерно примерно $2,5x10^9$ питающих клеток к примерно $25x10^6$ ОИЛ.

[00413] 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 мононуклеарные 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).

[00414] 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 и 27.

[00415] В одном из вариантов осуществления искусственные антигенпредставляющие клетки используют во время второго размножения вместо, или в сочетании с, МКПК.

2. Цитокины

[00416] 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.

[00417] 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.

3. Анти-CD3 антитела

[00418] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования, используемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (включая те, которые называют ПБР, смотри, например, Фигуру 27), 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.

[00419] 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 OKT3 (коммерчески доступное от компании Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

E. Этап E: Сбор ОИЛ

[00420] 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 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают после двух этапов размножения, например, как показано на Фигуре 27.

[00421] 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.

[00422] 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.

[00423] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток, например, этап E на Фигуре 27, 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.

[00424] В некоторых вариантах осуществления этап E на Фигуре 27 проводят способами, описанными в Примере 30. 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 30.

[00425] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ собирают способами, описанными в примере 30. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ в дни 1-11 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.5 (в примере 30 процесс называют сбором ОИЛ в день 11). В некоторых вариантах осуществления ОИЛ в дни 12-22 собирают с использованием способов, описанных в разделе 8.12 (в примере 30 процесс называют сбором ОИЛ в день 22).

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

[00426] После завершения этапов A-E, представленных в иллюстративном порядке на Фигуре 27 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.

[00427] 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 внутрилимфатический.

1. Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования

[00428] 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 внутриартериальной или внутривенной инфузией, которая, предпочтительно, продолжается примерно 30-60 минут. Другие подходящие пути введения включают внутрибрюшинный, интратекальный и внутрилимфатический пути введения.

[00429] Можно вводить любую подходящую дозу ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления вводят от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$ ОИЛ, в среднем примерно $7,8\times10^{10}$ ОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В одном из вариантов осуществления вводят от примерно $1,2\times10^{10}$ до примерно $4,3\times10^{10}$ 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 $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет примерно $7,8\times10^{10}$ ОИЛ, в частности, если рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективная доза составляет от примерно $1,2\times10^{10}$ до примерно $4,3\times10^{10}$ 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.

[00430] 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}.

[00431] 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.

[00432] 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%, 125%, 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.

[00433] 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.

[00434] 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.

[00435] 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.

[00436] 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, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[00437] 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.

[00438] 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.

[00439] 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}.

[00440] 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 мг 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.

[00441] 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.

[00442] 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, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, топически, путем трансплантации или путем ингаляции.

G. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток

[00443] Необязательно, анализ на жизнеспособность клеток можно проводить после этапа B первого размножения, 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 MTT.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00444] 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.

[00445] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют в отношении процентного содержания популяции CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, предназначенные для использования в лечении, анализируют в отношении процентного содержания популяции CD3+ клеток. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ представляют собой CD3+/CD45+ ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 70% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 99,9%. В некоторых

вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 97,1%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 80% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 85% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 90% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 85% до примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 80% до примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+ клеток составляет от примерно 95% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 70% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 74% до примерно 97,1%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 80% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 85% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 90% до примерно 99,9%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 85% до примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 80% до примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления процентное содержание CD3+/CD45+ клеток составляет от примерно 95% до примерно 99,9%.

[00446] 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

[00447] 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.

[00448] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной 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).

[00449] 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.

[00450] 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 A1, 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. 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/см^2 до уровня 10×10^6-30×10^6 клеток/см^2. 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.

Необязательная генетическая модификация ОИЛ

[00451] 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).

H. Необязательное криоконсервирование ОИЛ

[00452] Как описано выше, и приведено в качестве примера на этапах A-E Фигуры 27, 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 27). 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.

[00453] 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.

I. Фенотипические характеристики размноженных ОИЛ

[00454] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после размножения анализируют на экспрессию многочисленных фенотипических маркеров, включая те, которые описаны в настоящем документе и в примерах. В одном из вариантов осуществления анализируют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики ОИЛ анализируют после первого размножения на этапе B. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики ОИЛ анализируют в процессе перехода на этапе C. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики ОИЛ анализируют в процессе перехода на этапе C и после криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики ОИЛ анализируют после второго размножения на этапе D. В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики ОИЛ анализируют после двух или более этапов размножения на этапе D. В некоторых вариантах осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из TCRab (то есть, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из TCRab (то есть, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 и CD8a. В одном из вариантов осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления анализируют экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцати маркеров. В некоторых вариантах осуществления анализируют экспрессию одного или более маркеров из каждой группы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более из HLA-DR, CD38 и CD69 сохраняется (то есть, статистически значимо не отличается) в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления статус активации ОИЛ сохраняется в размороженных ОИЛ.

[00455] В одном из вариантов осуществления измеряют экспрессию одного или

более регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1 и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторной молекулы снижена в размороженных ОИЛ в сравнении со свежими ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул LAG-3 и TIM-3 снижена в размороженных ОИЛ в сравнении со свежими ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная разница в экспрессии CD4, CD8, NK и TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная разница в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ и/или маркеров клеток памяти в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная разница в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ между ОИЛ, полученными способами, описанными в настоящем документе, например, на Фигуре 27, и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27.

[00456] В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ, собранной популяции ОИЛ и/или терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ ни на одном из этапов, включая те, которые описаны выше или представлены, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор второй популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор третьей популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ.

[00457] В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ ни на одном из этапов (a) - (f) способа размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающего:

(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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[00458] В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD4, CD8 и/или NK, TCRαβ ни на одном из этапов (a) - (h) способа лечения субъекта, страдающего от рака, включающего введение размноженных опухоль-инфильтрирующие лимфоцитов (ОИЛ) и включающего:

(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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом

второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

[00459] В некоторых вариантах осуществления маркер клеток памяти выбирают из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

[00460] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежих, так и размороженных, ОИЛ превышает 70%, превышает 75%, превышает 80%, превышает 85%, превышает 90%, превышает 95% или превышает 98%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежего, так и размороженного, препарата превышает 80%, превышает 81%, превышает 82%, превышает 83%, превышает 84%, превышает 85%, превышает 86%, превышает 87%, превышает 88%, превышает 89% или превышает 90%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежего, так и размороженного, препарата превышает 86%.

[00461] В одном из вариантов осуществления рестимулированные ОИЛ также можно оценивать на секрецию цитокинов, с использованием анализов на секрецию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно оценивать на секрецию интерферона-7 (IFN-7) в ответ либо на стимуляцию OKT3, либо на совместное культивирование с аутологичным гидролизатом опухоли. Например, в вариантах осуществления, в которых используют стимуляцию OKT3, ОИЛ тщательно промывают, и в двух повторах вносят по $1x10^5$ клеток в 0,2 мл СМ в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов, предварительно покрытые OKT3, разбавленным до концентрации 0,1 или 1,0 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение ночи супернатанты собирают, и содержание IFN-7 в супернатанте измеряют методом ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Для анализа совместного культивирования $1x10^5$ клеток ОИЛ помещают в

лунки 96-луночного планшета с аутологичными клетками опухоли (соотношение 1:1). После 24-часовой инкубации супернатанты собирают, и секрецию IFN-7 можно определять количественно, например, методом ELISA.

[00462] Анализ методом проточной цитометрии биомаркеров клеточной поверхности: образцы ОИЛ разделяли на аликвоты для анализа методом проточной цитометрии маркеров клеточной поверхности, смотри, например, примеры 7, 8 и 9.

[00463] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ оценивают на экспрессию различных регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из TCR α/β, CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R-, CCR7, CD62L, KLRG1 и CD122. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой TCR α/β. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD56. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD27. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD28. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD57. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD45RA. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD45RO. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD25. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD127. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD95. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой IL-2R-. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CCR7. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD62L. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой KLRG1. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер представляет собой CD122.

[00464] В одном из вариантов осуществления размноженные ОИЛ анализируют на экспрессию многочисленных фенотипических маркеров, включая те, которые описаны в настоящем документе и в примерах. В одном из вариантов осуществления анализируют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. В некоторых вариантах осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из TCRab (то есть, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из TCRab (то есть, TCR α/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56 и CD8a. В одном из вариантов осуществления маркер выбирают из группы, состоящей из CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38 и HLA-DR. В некоторых вариантах осуществления анализируют экспрессию одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти, одиннадцати, двенадцати, тринадцати или четырнадцати маркеров. В некоторых вариантах осуществления анализируют экспрессию одного или более маркеров из каждой группы. В некоторых вариантах осуществления экспрессия одного или более из HLA-DR, CD38 и CD69 сохраняется (то есть, статистически значимо не отличается) в свежих ОИЛ в

сравнении с размороженными ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления статус активации ОИЛ сохраняется в размороженных ОИЛ.

[00465] В одном из вариантов осуществления измеряют экспрессию одного или более регуляторных маркеров. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1 и TIM-3. В некоторых вариантах осуществления регуляторный маркер выбирают из группы, состоящей из CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1 и CD154. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторной молекулы снижена в размороженных ОИЛ в сравнении со свежими ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления экспрессия регуляторных молекул LAG-3 и TIM-3 снижена в размороженных ОИЛ в сравнении со свежими ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная разница в экспрессии CD4, CD8, NK и TCRαβ. В некоторых вариантах осуществления отсутствует существенная разница в экспрессии CD4, CD8, NK, TCRαβ и/или маркеров клеток памяти в свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ.

[00466] В некоторых вариантах осуществления маркер клеток памяти выбирают из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

[00467] В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность свежих ОИЛ в сравнении с размороженными ОИЛ составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежих, так и размороженных, ОИЛ превышает 70%, превышает 75%, превышает 80%, превышает 85%, превышает 90%, превышает 95% или превышает 98%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежего, так и размороженного, препарата превышает 80%, превышает 81%, превышает 82%, превышает 83%, превышает 84%, превышает 85%, превышает 86%, превышает 87%, превышает 88%, превышает 89% или превышает 90%. В некоторых вариантах осуществления жизнеспособность как свежего, так и размороженного, препарата превышает 86%.

[00468] В одном из вариантов осуществления рестимулированные ОИЛ также можно оценивать на секрецию цитокинов с использованием анализов на секрецию цитокинов. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ можно оценивать на секрецию интерферона-7 (IFN-7) в ответ либо на стимуляцию OKT3, либо на совместное культивирование с аутологичным гидролизатом опухоли. Например, в вариантах осуществления, в которых используют стимуляцию OKT3, ОИЛ тщательно промывают, и в двух повторах вносят по $1x10^5$ клеток в 0,2 мл СМ в лунки 96-луночных плоскодонных планшетов, предварительно покрытые OKT3, разбавленным до концентрации 0,1 или 1,0 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере. После инкубации в течение ночи супернатанты собирают, и содержание IFN-7 в супернатанте измеряют методом ELISA (Pierce/Endogen, Woburn, MA). Для анализа совместного культивирования $1x10^5$ клеток ОИЛ помещают в

лунки 96-луночного планшета с аутологичными клетками опухоли (соотношение 1:1). После 24-часовой инкубации супернатанты собирают, и секрецию IFN-7 можно определять количественно, например, методом ELISA.

[00469] В некоторых вариантах осуществления фенотипические характеристики анализируют после криоконсервирования.

J. Метаболическое здоровье размноженных ОИЛ

[00470] Рестимулированные ОИЛ характеризуются значительным повышением базального гликолиза в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или размороженными ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ, собранной популяции ОИЛ и/или терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8 ни на одном из этапов, включая те, которые описаны выше или представлены, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор второй популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор третьей популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8.

[00471] В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8 ни на одном из этапов (a) - (f) способа размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающего:

(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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую

популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[00472] В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8 ни на одном из этапов (a) - (h) способа лечения субъекта, страдающего от рака, включающего введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) и включающего:

(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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

(g) необязательно, криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего

собранную популяцию ОИЛ из этапа (f), с использованием способа криоконсервирования; и

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

[00473] ОИЛ, полученные способами, описанными в настоящем документе, характеризуются значительным повышением базального гликолиза в сравнении с, например, 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 27. В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ, собранной популяции ОИЛ и/или терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8 ни на одном из этапов, включая те, которые описаны выше или представлены, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор второй популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор третьей популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В некоторых вариантах осуществления не проводят отбор терапевтической популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8. В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основании экспрессии CD8 ни на одном из этапов (a) - (h).

[00474] Запасная дыхательная емкость (SRC) и гликолитический резерв можно оценивать для ОИЛ, размноженных разными способами по настоящему изобретению. В анализе Seahorse XF Cell Mito Stress Test измеряют митохондриальную функцию путем прямого измерения скорости поглощения кислорода (OCR) клетками, с использованием модуляторов дыхания, которые направлены на компоненты цепи транспорта электронов в митохондриях. Тестовые соединения (олигомицин, FCCP и смесь ротенона и антимицина A, описанные ниже) серийно инъецируют для измерения продуцирования АТФ, максимального дыхания и не митохондриального дыхания, соответственно. Затем рассчитывают утечку протонов и запасную дыхательную емкость с использованием этих параметров и базального дыхания. Каждый модулятор направлен на конкретный компонент цепи транспорта электронов. Олигомицин ингибирует АТФ-синтазу (комплекс V), и уменьшение OCR после инъекции олигомицина коррелирует с митохондриальным дыханием, связанным с клеточным продуцированием АТФ. Карбонил-цианид 4 (трифторметокси) фенилгидразон (FCCP) является разобщителем, который разрушает протонный градиент и нарушает потенциал митохондриальной мембраны. В результате поток электронов в цепи транспорта электронов становится свободным и кислород максимально поглощается комплексом IV. Затем можно использовать FCCP-стимулированную OCR для расчета запасной дыхательной емкости, определяемой, как

разница между максимальным дыханием и базальным дыханием. Запасная дыхательная емкость (SRC) является мерой способности клетки реагировать на повышенную потребность в энергии. Третья инъекция представляет собой смесь ротенона, ингибитора комплекса I, и антимицина A, ингибитора комплекса III. Эта комбинация отключает митохондриальное дыхание и позволяет рассчитывать не митохондриальное дыхание, управляемое процессами за пределами митохондрий. В некоторых вариантах осуществления проводят сравнение, например, с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27.

[00475] В некоторых вариантах осуществления анализ метаболизма представляет собой анализ базального дыхания. Как правило, ОИЛ после второго размножения имеют скорость базального дыхания, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от примерно 50% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от примерно 60% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от примерно 70% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от примерно 80% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания составляет от примерно 90% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления скорость базального дыхания

составляет от примерно 95% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют скорость базального дыхания, которая не отличается статистически значимо от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления проводят сравнение, например, с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27.

[00476] В некоторых вариантах осуществления анализ метаболизма представляет собой анализ запасной дыхательной емкости. Как правило, ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют запасную дыхательную емкость, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 50% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 50% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 60% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 70% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 80% до примерно

99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 90% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления запасная дыхательная емкость составляет от примерно 95% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют запасную дыхательную емкость, которая не отличается статистически значимо от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27.

[00477] Как правило, ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют запасную дыхательную емкость, которая составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления анализ метаболизма представляет собой анализ гликолитического резерва. В некоторых вариантах осуществления анализ метаболизма представляет собой анализ запасной дыхательной емкости. Для измерения клеточного (дыхательного) метаболизма клетки обрабатывали ингибиторами митохондриального дыхания и гликолиза для определения метаболического профиля ОИЛ, состоящего из следующих показателей: базовое окислительное фосфорилирование (измеряемое на основании OCR), запасная дыхательная емкость, базовая гликолитическая активность (измеряемая на основании ECAR) и гликолитический резерв. Метаболические профили получали с использованием анализа Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test (включая набор, коммерчески доступный от компании Agilent®), который позволяет определять способность клеток осуществлять гликолиз при блокировании митохондриального продуцирования АТФ. В некоторых вариантах осуществления клетки лишали глюкозы, затем инъецировали глюкозу, с последующей инъекцией стрессового средства. В некоторых вариантах осуществления стрессовое средство выбирают из группы, состоящей

из олигомицина, FCCP, ротенона, антимицина А и/или 2-дезоксиглюкозы (2-DG), а также их сочетания. В некоторых вариантах осуществления олигомицин добавляют в концентрации 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления FCCP добавляют в концентрации 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления ротенон добавляют в концентрации 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления антимицин А добавляют в концентрации 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления 2-дезоксиглюкозу (2-DG) добавляют в концентрации 500 мМ. В некоторых вариантах осуществления измеряют гликолитическую активность, гликолитический резерв и/или не гликолитическую ацидификацию. Как правило, ОИЛ имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 50% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 60% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 70% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 80% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 90% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 95% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27.

[00478] В некоторых вариантах осуществления анализ метаболизма представляет собой анализ базального гликолиза. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в три раза, по меньшей мере в четыре раза, по меньшей мере в пять раз, по меньшей мере в шесть раз, по меньшей мере в семь раз, по меньшей мере в восемь раз, по меньшей мере в девять раз или по меньшей мере в десять раз в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза примерно в два-десять раз в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза примерно в два-восемь раз в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза примерно в три-семь раз в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза примерно в два-четыре раза в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют увеличение базального гликолиза примерно в два-три раза в сравнении с свежесобранными ОИЛ и/или ОИЛ, полученными иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех,

которые представлены на Фигуре 27.

[00479] Как правило, ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют гликолитический резерв, который составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 50% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 60% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 70% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 80% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 90% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ и/или ОИЛ, полученных иными способами, чем те, которые описаны в настоящем документе, в том числе, например, способами, отличными о тех, которые представлены на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления гликолитический резерв составляет от примерно 95% до примерно 99% от скорости базального дыхания свежесобранных ОИЛ.

[00480] Продуцирование гранзима B: гранзим B 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 B 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 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) демонстрируют повышенное продуцирование гранзима B. В некоторых вариантах

осуществления ОИЛ после второго размножения или ОИЛ после второго дополнительного размножения (такие как, например, те, которые описаны на этапе D Фигуры 27, включая ОИЛ, называемые ре-ПБР ОИЛ) имеют повышенную цитотоксическую активность.

[00481] 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 о тех, которые представлены на Фигуре 27. 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. В некоторых вариантах осуществления отсутствует изменение длины теломер между первоначально собранными ОИЛ на этапе A и размноженными ОИЛ, например, на этапе D, как показано на Фигуре 27.

[00482] 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. В некоторых вариантах осуществления увеличение продуцирования IFN-γ, например, на этапе D, показанном на Фигуре 27, ОИЛ в сравнении с первоначально собранными ОИЛ, например, на этапе A, показанном на Фигуре 27, является показателем увеличения цитотоксического потенциала ОИЛ на этапе D. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в один раз, в два раза, в три раза, в четыре раза, в пять раз или более. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в один раз. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в два раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в три раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в четыре раза. В некоторых вариантах осуществления секреция IFN-γ увеличивается в пять раз. В некоторых вариантах осуществления уровень IFN-γ измеряют с использованием набора Quantikine® ELISA kit. В некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в ОИЛ ex vivo. В

некоторых вариантах осуществления IFN-γ измеряют в ОИЛ ex vivo, включая ОИЛ, полученные способами по настоящему изобретению, в том числе, например, способами, представленными на Фигуре 27, а также свежесобранные ОИЛ или ОИЛ, полученные иными способами, такими как те, которые представлены, например, на Фигуре 83 (такими как, например, способ 1C для ОИЛ).

[00483] 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.

[00484] 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 27. 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 27.

[00485] 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 о тех, которые представлены на Фигуре 27. 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 о тех, которые представлены на Фигуре 27. 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 ранее была размножена;

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

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, OKT-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, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, и при этом третью популяцию дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[00486] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает:

(iv) проведение дополнительного второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток третьей популяции ОИЛ дополнительного IL-2, дополнительного OKT-3 и дополнительных АПК, при этом дополнительное второе размножение проводят в течение по меньшей мере 14 дней, с получением более крупной популяции ОИЛ, чем полученная на этапе (iii), при этом более крупная популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении с третьей популяцией ОИЛ, и при этом третью популяцию дополнительно анализируют на жизнеспособность.

[00487] В некоторых вариантах осуществления перед этапом (i) клетки криоконсервируют.

[00488] В некоторых вариантах осуществления клетки размораживают перед проведением этапа (i).

[00489] В некоторых вариантах осуществления этап (iv) повторяют от одного до четырех раз с целью получения достаточного количества ОИЛ для анализа.

[00490] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 40 дней до примерно 50 дней.

[00491] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 48 дней.

[00492] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение периода времени от примерно 42 дней до примерно 45 дней.

[00493] В некоторых вариантах осуществления этапы (i) - (iii) или (iv) проводят в течение примерно 44 дней.

[00494] В некоторых вариантах осуществления клетки на этапах (iii) или (iv) экспрессируют CD4, CD8 и TCR α/β на уровнях, аналогичных уровням в свежесобранных клетках.

[00495] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[00496] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-17 на этапе (iii).

[00497] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в более крупной популяции ОИЛ на этапе (iv) обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, относительно эффекторных Т-клеток, и/или центральных Т-клеток памяти в третьей популяции клеток.

[00498] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56.

[00499] В некоторых вариантах осуществления АПК представляют собой искусственные АПК (иАПК).

[00500] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00501] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00502] 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.

[00503] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00504] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность.

[00505] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования.

[00506] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после криоконсервирования и после этапа (iv).

[00507] 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 (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 о тех, которые представлены на Фигуре 27. 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 TCRab (то есть, TCR α/β).

[00508] 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, с получением второй популяции ОИЛ; и

(iii) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, OKT-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, OKT-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).

[00509] 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.

[00510] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

[00511] 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.

[00512] В некоторых вариантах осуществления клетки на этапах (iii) или (vii) экспрессируют CD4, CD8, и TCR α/β на уровнях, аналогичных уровням в свежесобранных клетках. В некоторых вариантах осуществления клетки представляют собой ОИЛ.

[00513] 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).

[00514] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в более крупной популяции ОИЛ на этапах (iii) или (vii) обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27, экспрессии CD28, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти в третьей популяции клеток.

[00515] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56.

[00516] В некоторых вариантах осуществления АПК представляют собой искусственные АПК (иАПК).

[00517] В некоторых вариантах осуществления проводят этап трансдукции первой популяции ОИЛ экспрессионным вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую высокоаффинный Т-клеточный рецептор.

[00518] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00519] В некоторых вариантах осуществления проводят 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.

[00520] В некоторых вариантах осуществления этап трансдукции происходит до этапа (i).

[00521] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ анализируют на жизнеспособность после этапа (vii).

[00522] 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, OKT-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).

[00523] В некоторых вариантах осуществления соотношение количества ОИЛ во второй популяции ОИЛ и количества ОИЛ в части первой популяции ОИЛ превышает 50:1.

[00524] 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.

[00525] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает

введение всей первой популяции криоконсервированных ОИЛ из этапа (i) пациенту.

K. Закрытые системы для производства ОИЛ

[00526] 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.

[00527] 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.

[00528] В некоторых вариантах осуществления закрытые системы включают крепление Люэра и герметизированные термосваркой системы, описанные, например, в примере 30. 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 30. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ формулируют в конечный препарат в контейнере способом, описанным в примере 30, раздел 8.14 «Окончательное формулирование и фасовка».

[00529] Как указано на вебсайте FDA, закрытые системы и способы стерильного культивирования известны и подробно описаны. Смотри https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm, выше, и описание соответствующей части ниже.

Введение

[00530] 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.

1. Рекомендации FDA

[00531] Производители препаратов крови, планирующие постоянно использовать разрешенные FDA STCD, должны включать информацию о таком использовании в стандартную операционную процедуру (СОП) для каждого препарата крови. Эти записи

должны включать учет, отслеживание продукции, контроль качества сварного шва, номера партий программного обеспечения и утилизируемых материалов (включая источник(и) добавляемых элементов). Процедуры контроля качества должны включать проверку целостности каждого сварного шва.

2. Применение STCD

[00532] Пользователь должен знать, что использование устройства может приводить к созданию нового продукта, или существенному изменению конфигурации регламентированного продукта, для которого безопасность и эффективность не были продемонстрированы. Для тех «новых продуктов», которые подлежат лицензированию, заявки, или дополнения к заявкам, должны быть поданы в FDA, в дополнение к подаче СОП. Как правило, объединение или смешивание клеточных компонентов представляет собой изменение в продукте, которое требует подачи и одобрения заявки, или дополнения к заявке, на лицензирование. Такие заявки, или дополнения к заявкам, должны содержать данные и описания производственных процедур, которые свидетельствуют о том, что «новый продукт» безопасен и эффективен для его предполагаемого использования в течение предлагаемого срока.

[00533] Следующие комментарии приведены в качестве руководства по более распространенному использованию STCD, разрешенных для использования или одобренных FDA:

L. Добавление новой или меньшего размера иглы в набор для сбора крови

[00534] Использование STCD для добавления иглы до начала процедуры (сбора цельной крови, тромбофереза или сбора источника плазмы) не считается открытием функционально закрытой системы. Если иглу добавляют во время процедуры, следует использовать только STCD, одобренный для сваривания заполненных жидкостью трубок. Если проверка целостности сварного шва дает удовлетворительные результаты, использование STCD не считается открытием функционально закрытой системы.

[00535] Тромбоциты, полученные при плазмаферезе в открытой системе, должны иметь указанный срок годности 24 часа, и тромбоциты, полученные при плазмаферезе в функционально закрытой системе, должны иметь указанный срок годности пять дней (смотри Revised Guideline for Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

[00536] Источник и спецификации добавленных трубок и игл должны быть указаны в СОП и учетных записях центров сбора крови. Использование STCD для добавления игл не является серьезным изменением в производственном процессе, для которого лицензированные учреждения должны получать предварительное одобрение.

M. Использование STCD для подготовки компонентов

[00537] Когда STCD используют для присоединения дополнительных мешков для подготовки компонентов, следует надлежащим образом вести записи с указанием источника упаковок для переноса и соответствующей проверки количества единиц крови и ABO/Rh. Вся кровь и компоненты крови должны быть соответствующим образом маркированы (21 CFR 606.121).

Примеры:

- Добавление четвертого мешка к тройной упаковке для сбора цельной крови для получения криопреципитата AHF из свежей замороженной плазмы.

- Соединение дополнительного раствора с единицей эритроцитарной массы.

- Добавление встроенного фильтра, который был разрешен FDA для использования в производстве компонентов.

- Добавление третьего контейнера для хранения к комплекту для тромбофереза.

- Для вышеуказанных вариантов использования следует разрабатывать процедуры и вести записи, но лицензиаты не должны получать одобрение FDA для проведения процедур.

1. Использование STCD для объединения препаратов крови

[00538] Соответствующее использование STCD для объединения тромбоцитов, полученных из цельной крови, может устранить потенциальное загрязнение от обычно используемых игл и портов. Объединение, выполненное непосредственно перед переливанием, является примером такого подходящего использования. Объединенные тромбоциты следует вводить не более чем через 4 часа после объединения (Смотри 21 CFR 606.122(l)(2)).

[00539] Однако объединение и последующее хранение может увеличивать риск по сравнению с введением единиц тромбоцитарной массы отдельных доноров; если одну загрязненную единицу объединить с другими и хранить до введения, общий введенный бактериальный инокулят может увеличиваться в результате репликации в дополнительном объеме. Соответственно, предлагаемое использование STCD для объединения и хранения тромбоцитов в течение более чем 4 часов должно быть поддержано данными соответствующего исследования того, связано ли такое объединение с повышенным риском.

[00540] Такое объединение тромбоцитов представляет собой производство нового продукта.

[00541] Объединение или смешивание тромбоцитов считается изготовлением нового продукта, требующим подачи и утверждения заявки, или дополнения к заявке, на лицензию, если срок хранения превышает четыре часа.

2. Использование STCD для получения аликвот для педиатрического использования и разделенных единиц

[00542] Педиатрические единицы и разделенные единицы для цельной крови, эритроцитов и свежезамороженной плазмы, полученные с использованием STCD, не будут рассматриваться как новый продукт, для которого требуется дополнение к заявке на лицензирование биопрепарата (BLA), при соблюдении следующих условий:

Изготовитель должен иметь утвержденную лицензию, или дополнение к лицензии, на производство биопрепарата, для оригинального (то есть, неразделенного) продукта, включая утверждение для каждого используемого антикоагулянта.

Этикетки должны быть представлены на рассмотрение и утверждение перед

распространением. Отметка должна быть в разделе для комментариев FDA Form 2567, Transmittal of Labels and Circulars.

Следует использовать контейнеры для конечного продукта, утвержденные для хранения изготавливаемого компонента.

[00543] Тромбоциты, изготовленные в соответствии с лицензией, должны содержать по меньшей мере 5,5 x 10^{10} тромбоцитов (21 CFR 640.24 (c)). Тромбоциты, полученные при плазмаферезе в соответствии с лицензией, должны содержать по меньшей мере 3,0 x 10^{11} тромбоцитов (Смотри Revised Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988).

[00544] Процедуры, которых следует придерживаться в отношении использования STCD для подготовки разделенных продуктов из цельной крови, а также из плазмы и тромбоцитов, полученных с использованием процедур автоматизированного гемафереза, должны включать описания:

- того, как устройство для афереза или контейнер для сбора будут модифицированы за счет одобренного FDA STCD;

- минимального объема разделенной плазмы или препаратов цельной крови;

- объема и концентрации тромбоцитов в разделенных продуктах тромбафереза;

- срока хранения продукта. Продукт должен находиться в одобренном контейнере и должен соответствовать сроку хранения, указанному этикетке такого контейнера;

- способа(ов), используемого для маркировки и отслеживания разделенных продуктов в учетных записях центра сбора крови.

[00545] ПРИМЕЧАНИЕ: Способы маркировки аликвот должны быть четко указаны в процедуре ведения записей и должны быть достаточными для отслеживания и отозвания всех компонентов, в случае необходимости.

3. Использование STCD для соединения дополнительных линий для солевого раствора или антикоагулянта во время автоматизированной процедуры плазмафереза

[00546] Следует разрабатывать процедуры и вести записи, согласующиеся с инструкциями производителя устройства по применению, но лицензиаты на обязаны иметь одобрение FDA для выполнения процедур.

4. Использование STCD для подведения обрабатывающих растворов

[00547] В случае использования STCD для присоединения контейнеров с обрабатывающими растворами для промывания или замораживания эритроцитов, срок хранения полученных продуктов составляет 24 часа, если не предоставлены данные в форме заявок, или дополнений к заявкам, на лицензию CBER в пользу использования более длительного периода времени (21 CFR 610.53(c)). Исключения или модификации должны быть одобрены в письменной форме Директором, CBER (21 CFR 610.53(d)).

5. Использование STCD для дополнительного введения разрешенного FDA фильтра для уменьшения количества лейкоцитов

[00548] В некоторых случаях уменьшающие количество лейкоцитов фильтры

исходно не установлены в системах для сбора цельной крови. Процедуры использования STCD для фильтрования перед хранением должны соответствовать инструкциям производителя фильтра по его применению.

[00549] Уменьшение количества лейкоцитов перед выпуском является серьезным изменением производственного процесса. Таким образом, для новых продуктов с уменьшенным количеством лейкоцитов, получаемых с использованием STCD, производители должны подавать заявки, или дополнения к ранее одобренным заявкам, на лицензию для производства биопрепаратов (21 CFR 60.2) в FDA (21 CFR 601.12).

[00550] Использование STCD для извлечения из контейнеров с препаратами крови образцов для тестирования (например, использование STCD для получения образца тромбоцитов из контейнера с тромбоцитами или тромбоцитами, полученными при плазмаферезе, для перекрестного сопоставления).

[00551] Если объем и/или количество клеток продукта после отбора образца отличается от того, что заявлено в оригинальной этикетке или в информационном циркуляре, этикетку на продукте следует изменять для отображения нового объема и/или количества клеток. Например, не следует извлекать образцы, которые приведут к уменьшению количества тромбоцитов единицы тромбоцитарной массы до менее чем $5,5x(10)^{10}$ тромбоцитов (21 CFR 640.24 (c)).

6. Дополнительная информация из руководства FDA

[00552] Руководство FDA предоставляет общее руководство, а также конкретную информацию и примеры, относящиеся к спецификациям для подачи в FDA заявок, и приложений к заявкам, касающихся использования STCD. Если возникнут дополнительные вопросы, касающиеся надлежащего использования STCD, запросы следует направлять в Office of Blood Research и Review, Center for Biologics Evaluation и Research.

[00553] 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 HypoThermosol-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.

[00554] 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%.

[00555] Закрытая система позволяет ОИЛ расти в отсутствие и/или при значительной степени уменьшения микробного загрязнения.

[00556] 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 pH, 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 pH, 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.

[00557] 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.

[00558] 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 OKT3, а также их сочетание.

C. Культуры клеток

[00559] В одном из вариантов осуществления способ размножения ОИЛ, включая те, которые описаны выше, а также представлены на Фигуре 27, 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.

[00560] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной 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).

[00561] 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 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.

[00562] 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 A1, 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.

[00563] 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/см^2 до уровня 10×10^6-30×10^6 клеток/см^2. 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

[00564] 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).

E. Необязательное криоконсервирование ОИЛ

[00565] 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 27. 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°С, с переносом, необязательно, в морозильные камеры с газообразным азотом для криоконсервирования. Смотри Sadeghi, et al., Acta Oncologica **2013,** 52, 978-986.

[00566] При необходимости, клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают при 37°С в водяной бане до тех пор, пока не будет размерзено 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.

[00567] 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 IL-2.

[00568] Как описано выше для этапов A-E, криоконсервирование можно проводить в различные моменты времени на всем протяжении процесса размножения ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления можно криоконсервировать суммарную популяцию ОИЛ после первого размножения на этапе B 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% AB 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.

[00569] 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.

[00570] В некоторых случаях популяцию ОИЛ, полученную на этапе B, можно криоконсервировать немедленно с использованием протоколов, описанных ниже. Альтернативно, суммарную популяцию ОИЛ можно проводить через этап C 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 B или этапе D, можно подвергать генетическим модификациям для соответствующего лечения.

F. Необязательные анализы на жизнеспособность клеток

[00571] 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 MTT.

1. Количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00572] 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.

[00573] 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

[00574] 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 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.

[00575] В одном из вариантов осуществления среда для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере является нефильтрованной. Использование нефильтрованной 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).

[00576] 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.

[00577] 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 A1, 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.

[00578] 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/см^2 до уровня 10×10^6-30×10^6 клеток/см^2. 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.

[00579] 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).

IV. Способы лечения пациентов

[00580] 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.

[00581] Размноженные ОИЛ, полученные способами, описанными в настоящем документе, включая, например, способы, описанные для этапов A-F, выше (также представленные, например, на Фигуре 27), 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 мм^3 до 3 мм^3. 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 IL-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.

[00582] 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 27), 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 27), выбирают для дополнительного второго размножения, как показано на этапе D Фигуры 27.

[00583] 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.

[00584] 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.

[00585] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на Фигуре 27, отличаются удивительным повышением клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами, предложенными в настоящем документе, например, теми, которые представлены на Фигуре 27, 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 27. В некоторых вариантах осуществления способы, иные, чем те, которые описаны в настоящем документе, включают способы, называемые способом 1C и/или способом поколения 1 (Gen 1). В некоторых вариантах осуществления клиническую 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 27, 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 27, например, способ Gen 1.

[00586] 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27.

[00587] В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. Продуцирование IP-10 можно измерять путем определения уровней IP-10 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 является показателем эффективности лечения у пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления уровень IP-10 измеряют в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления уровень IP-10 измеряют в сыворотке ОИЛ от субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27.

[00588] В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. Продуцирование MCP-1 можно измерять путем определения уровней MCP-1 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 является показателем эффективности лечения у пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень

MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления уровень MCP-1 измеряют в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления уровень MCP-1 измеряют в сыворотке ОИЛ от субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27.

[00589] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, включая те, которые не представлены на Фигуре 27, такими как, например, способы, называемые способом 1C. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27.

[00590] Показатели эффективности могут включать количественные показатели частоты контроля заболевания (ЧКЗ), а также частоты общего ответа (ЧОО), как известно в данной области и описано в примерах, приведенных в настоящем документе, включая пример 28.

1. Способы лечения рака и других заболеваний

[00591] 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.

[00592] 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, неходжскинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярнойя лимфомы и лимфомы из клеток мантийной зоны.

[00593] 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 циклофосфамида в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дней 27 и 26 перед инфузией ОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м^2/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.

[00594] 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.

[00595] 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 27. 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 83. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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.

[00596] В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической

эффективности при лечении гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способом по настоящему изобретению, обеспечивают более высокий средний уровень IP-10 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 83. Продуцирование IP-10 можно измерять путем определения уровней IP-10 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 является показателем эффективности лечения у пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень IP-10 соответствует увеличению 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 27.

[00597] В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности при лечении гиперпролиферативных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, является показателем наличия активных ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способом по настоящему изобретению, обеспечивают более высокий средний уровень MCP-1 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способом по настоящему изобретению, в сравнении с субъектами, получавшими лечение ОИЛ, полученными способами, называемыми способом 1C, представленным на Фигуре 83. Продуцирование MCP-1 можно измерять путем определения уровней MCP-1 в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 является показателем эффективности лечения у пациента, получавшего лечение ОИЛ, полученными способами по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27. В некоторых вариантах осуществления более

высокий средний уровень MCP-1 соответствует увеличению 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 27.

[00598] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные способами по настоящему изобретению, включая те, которые описаны, например, на Фигуре 27, отличаются повышенной поликлональностью в сравнении с ОИЛ, полученными иными способами, включая те, которые не представлены на Фигуре 27, такими как, например, способы, называемые способом 1C. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27. 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 27.

2. Способы совместного введения

[00599] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ, полученные, как описано в настоящем документе, включая, например, ОИЛ, полученные способом, описанным для этапов A-F Фигуры 27, 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®), гуманизированное анти-PD-1 антитело JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное анти-PD-1 антитело TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (анти-PD-1 мАт CT-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 гуманизированное 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 A-F, 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 A-F, 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 A-F, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту, которому вводят ОИЛ, полученные в

соответствии с этапами A-F, 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 лимфодеплеция пациентов

[00600] 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 циклофосфамида в дозе 60 мг/кг/сутки в течение 2 дней (дней 27 и 26 перед инфузией ОИЛ) и флударабина в дозе 25 мг/м^2/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.

[00601] Экспериментальные результаты показывают, что лимфодеплеция 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.

[00602] Как правило, лимфодеплецию осуществляют путем введения флударабина или циклофосфамида (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.

[00603] 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.

[00604] 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/м^2/сутки, 150 мг/м^2/сутки, 175 мг/м^2/сутки, 200 мг/м^2/сутки, 225 мг/м^2/сутки, 250 мг/м^2/сутки, 275 мг/м^2/сутки или 300 мг/м^2/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/м^2/сутки в/в. В некоторых вариантах осуществления циклофосфамид вводят в течение 4 дней в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в.

[00605] В некоторых вариантах осуществления лимфодеплецию осуществляют путем совместного введения пациенту флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления флударабин вводят в дозе 25 мг/м^2/сутки в/в и циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в в течение 4 дней.

[00606] В одном из вариантов осуществления лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

4. Режимы введения IL-2

[00607] В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 представляет собой режим введения высоких доз IL-2, при этом режим введения высоких доз IL-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.

[00608] В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 представляет собой «декрещендо» режим введения IL-2. «Декрещендо» режимы введения IL-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 «декрещендо» режим введения IL-2 включает введение 18×10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 6 часов, с последующим введением 18×10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 12 часов, с последующим введением 18×10^6 МЕ/м^2 внутривенно в течение 24 часов, с последующим введением $4{,}5\times10^6$ МЕ/м^2 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 IL-2 включает введение 18000000 МЕ/м^2 в день 1, 9000000 МЕ/м^2 в день 2 и 4500000 МЕ/м^2 в дни 3 и 4.

[00609] В одном из вариантов осуществления режим введения IL-2 включает введение пегилированного IL-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

[00610] 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 27. 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

[00611] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения рака популяцией опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему этапы (a) 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 IL-2; (c) 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 IL-2 и OKT-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 IL-2; (c) 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 IL-2 и OKT-3; (d) введения терапевтически эффективного количества третьей популяции ОИЛ пациенту, страдающему от рака. В некоторых вариантах осуществления способ включает первый этап (a) получения первой популяции ОИЛ из опухоли, резецированной у пациента. В некоторых вариантах осуществления IL-2 присутствует в начальной концентрации примерно 3000 МЕ/мл, и антитело OKT-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 иАПК 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 циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/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.

V. Иллюстративные варианты осуществления

[00612] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение 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 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 11 дней, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 11 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

[00613] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования представляет собой криоконсервирование в среде, содержащей ДМСО. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% ДМСО. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования представляет собой CS10.

[00614] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

[00615] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

[00616] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

[00617] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-11 на этапе (d).

[00618] В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

[00619] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[00620] 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).

[00621] 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.

[00622] В некоторых вариантах осуществления третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенной эффективностью, повышенным продуцированием интерферона-гамма (IFN-γ), повышенной поликлональностью, повышенным средним уровнем IP-10 и/или повышенным средним уровнем MCP-1 при введении субъекту. В некоторых вариантах осуществления повышенный уровень IFN-γ, повышенный средний уровень IP-10 и/или повышенный средний уровень MCP-1 измеряют в крови субъекта, получавшего лечение ОИЛ.

[00623] 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. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки и НМРЛ. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой ПКГШ. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шейки матки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой НМРЛ.

[00624] В одном из вариантов осуществления изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ).

[00625] Настоящее изобретение относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему: (a) получение образца опухоли от пациента, при этом указанный образец опухоли содержит первую популяцию ОИЛ; (b) разделение указанного образца опухоли на множество опухолевых фрагментов; (c) помещение указанных опухолевых фрагментов в закрытый контейнер; (d) проведение начального размножения указанной первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, при этом указанное начальное размножение проводят в указанном закрытом контейнере, имеющем по меньшей мере 100 $см^2$ газопроницаемой поверхности, при этом указанное начальное размножение проводят в течение первого периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток указанную первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы; (e) размножение указанной второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток, при этом указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК, также известные как мононуклеарные клетки (МК)), при этом указанное размножение проводят в течение второго периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом указанная третья популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со

второй популяцией ОИЛ, при этом указанное размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем по меньшей мере 500 $см^2$ газопроницаемой поверхности, и при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; (f) сбор указанной третьей популяции ОИЛ, полученной на этапе (e), при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы; и (g) перенос указанной популяции ОИЛ, собранной на этапе (f), в инфузионный мешок, при этом указанный перенос из этапа (f) в этап (g) происходит без открывания системы. В некоторых вариантах осуществления способ представляет собой in vitro или ex vivo способ.

[00626] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает сбор клеток на этапе (f) с использованием системы обработки клеток, такой как система LOVO производства компании 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 случаях система обработки клеток может производить разделение, промывание, обмен жидкости, концентрирование клеток и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[00627] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер выбирают из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[00628] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (g) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[00629] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (d) и указанного второго периода на этапе (e) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[00630] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (d) и указанного второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

[00631] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (g) проводят в течение периода времени от примерно 25 дней до примерно 30 дней.

[00632] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (g) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 25 дней.

[00633] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (g) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

[00634] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (g) проводят в течение 22 дней или менее.

[00635] В некоторых вариантах осуществления этапы (c) - (f) проводят в одном контейнере, при этом проведение этапов (c) - (f) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль в сравнении с

проведением этапов (c) - (f) в более чем одном контейнере.

[00636] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (e) без открывания системы.

[00637] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00638] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00639] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[00640] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (g) вводят инфузией пациенту.

[00641] Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака у пациента популяцией опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему следующие этапы: (a) получение образца опухоли от пациента, при этом указанный образец опухоли содержит первую популяцию ОИЛ; (b) разделение указанного образца опухоли на множество опухолевых фрагментов; (c) помещение указанных опухолевых фрагментов в закрытый контейнер; (d) проведение начального размножения указанной первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, при этом указанное начальное размножение проводят в указанном закрытом контейнере, имеющем по меньшей мере 100 $см^2$ газопроницаемой поверхности, при этом указанное начальное размножение проводят в течение первого периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток указанную первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы; (e) размножение указанной второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток, при этом указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), при этом указанное размножение проводят в течение второго периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом указанная третья популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом указанное размножение проводят в закрытом контейнере,

имеющем по меньшей мере 500 $см^2$ газопроницаемой поверхности, и при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; (f) сбор указанной третьей популяции ОИЛ, полученной на этапе (e), при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы; (g) перенос указанной популяции ОИЛ, собранной на этапе (f), в инфузионный мешок, при этом указанный перенос из этапа (f) в этап (g) происходит без открывания системы; и (h) введение терапевтически эффективного количества ОИЛ из указанного инфузионного мешка на этапе (g) указанному пациенту.

[00642] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для использования в лечении рака, при этом популяция ОИЛ может быть получена способом, включающим следующие этапы: (b) разделение образца опухоли, полученного от пациента, при этом указанный образец опухоли содержит первую популяцию ОИЛ, на множество опухолевых фрагментов; (c) помещение указанных опухолевых фрагментов в закрытый контейнер; (d) проведение начального размножения указанной первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, при этом указанное начальное размножение проводят в указанном закрытом контейнере, имеющем по меньшей мере 100 $см^2$ газопроницаемой поверхности, при этом указанное начальное размножение проводят в течение первого периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству клеток указанную первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы; (e) размножение указанной второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток, при этом указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), при этом указанное размножение проводят в течение второго периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом указанная третья популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом указанное размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем по меньшей мере 500 $см^2$ газопроницаемой поверхности, и при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; (f) сбор указанной третьей популяции ОИЛ, полученной на этапе (e), при этом переход от этапа (e) к этапу (f) происходит без открывания системы; (g) перенос указанной популяции ОИЛ, собранной на этапе (f), в инфузионный мешок, при этом указанный перенос из этапа (f) в этап (g) происходит без открывания системы. В некоторых вариантах осуществления способ включает первый этап (a) получение образца опухоли от пациента, при этом указанный образец опухоли содержит первую популяцию ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления популяция ОИЛ предназначена для введения из указанного инфузионного мешка на этапе (g) в терапевтически эффективном количестве.

[00643] В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтически эффективного количества ОИЛ на этапе (h), было проведено лечение указанного пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции. В некоторых вариантах осуществления популяции ОИЛ предназначены для введения пациенту, который получал лечение с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

[00644] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[00645] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап лечения указанного пациента с применением режима введения высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения указанных ОИЛ указанному пациенту на этапе (h). В некоторых вариантах осуществления популяции ОИЛ предназначены для введения перед применением режима введения высоких доз IL-2. В некоторых вариантах осуществления популяция ОИЛ предназначена для введения за один день до начала применения режима введения высоких доз IL-2.

[00646] 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.

[00647] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00648] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00649] Настоящее изобретение также относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающему следующие этапы: (a) помещение разделенных опухолевых фрагментов в закрытую систему; (b) проведение первого размножения указанной первой популяции ОИЛ в первой среде для культивирования клеток, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная первая среда для культивирования клеток содержит IL-2, при этом указанное первое размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанное первое размножение проводят в течение первого периода времени, составляющего примерно 3-14 дней, с получением второй популяции ОИЛ, при этом указанная вторая популяция ОИЛ превосходит по меньшей мере в 50 раз по количеству

клеток указанную первую популяцию ОИЛ, и при этом переход от этапа (a) к этапу (b) происходит без открывания системы; (c) размножение указанной второй популяции ОИЛ во второй среде для культивирования клеток, при этом указанная вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющие клетки, при этом указанное размножение проводят в течение второго периода времени, составляющего примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом указанная третья популяция ОИЛ содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом указанное размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы; (d) сбор указанной третьей популяции ОИЛ, полученной на этапе (c), при этом переход от этапа (c) к этапу (d) происходит без открывания системы; и (e) перенос указанной собранной популяции ОИЛ из этапа (d) в инфузионный мешок, при этом указанный перенос из этапа (d) в (e) происходит без открывания системы.

[00650] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды CS10.

[00651] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК). В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[00652] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[00653] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают 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.

[00654] 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™.

[00655] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[00656] В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (b) и указанного второго периода на этапе (c) проводят в течение 10

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

[00657] В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 25 дней до примерно 30 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 25 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение 22 дней или менее. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[00658] В некоторых вариантах осуществления этапы (b) - (e) проводят в одной закрытой системе, 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.

[00659] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

[00660] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00661] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из указанной третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из указанной второй популяции клеток.

[00662] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[00663] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

[00664] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 10. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-Rex 500. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой газопроницаемый мешок - биореактор Xuri™ или Wave.

[00665] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к

способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(b) помещение опухолевых фрагментов в закрытую систему, при этом опухолевые фрагменты содержат первую популяцию ОИЛ;

(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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[00666] В некоторых вариантах осуществления способ также включает первый этап:

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

[00667] В одном из вариантов осуществления способ представляет собой in vitro или ex vivo способ.

[00668] 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 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

[00669] В одном из вариантов осуществления способ представляет собой in vitro или ex vivo способ.

[00670] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

[00671] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид. В некоторых вариантах осуществления среду для криоконсервирования выбирают из группы, состоящей из Cryostor CS10, HypoThermasol, или их сочетания.

[00672] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[00673] В некоторых вариантах осуществления МКПК являются облученными и аллогенными.

[00674] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

[00675] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[00676] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (e) проводят с

использованием системы обработки клеток LOVO.

[00677] В некоторых вариантах осуществления опухолевые фрагменты представляют собой множество фрагментов и 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.

[00678] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[00679] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[00680] 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. В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 25 дней до примерно 30 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 25 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (f) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[00681] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

[00682] 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.

[00683] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

[00684] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+,

экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00685] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00686] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[00687] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (f) вводят инфузией пациенту.

[00688] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента помещают в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,5 см. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента помещают в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см и помещены в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см и помещены в контейнер с объемом, эквивалентным объему G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,5 см и помещены в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,5 см и помещены в контейнер с объемом, эквивалентным объему G-REX 100.

[00689] Более подробное описание этапов (a), (b), (c), (d), (e) и (f) приведено ниже в настоящем документе, включая, например, но без ограничения, варианты осуществления, описанные под заголовками «ЭТАП A: Получение образца опухоли пациента», «ЭТАП B: Первое размножение», «ЭТАП C: Переход от первого размножения ко второму размножению», «ЭТАП D: «Втрое размножение», «ЭТАП E: Сбор ОИЛ» и «ЭТАП F: Окончательное формулирование/перенос в инфузионный мешок».

[00690] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака, включающему введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), который 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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

[00691] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к терапевтической популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для использования в лечении рака, при этом популяция может быть получена способом, включающим следующие этапы:

(b) помещение опухолевых фрагментов в закрытую систему, при этом опухолевые фрагменты содержат первую популяцию ОИЛ;

(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, с получением 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, OKT-3 и

антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

[00692] В некоторых вариантах осуществления популяция может быть получена способом, также включающим первый этап:

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

[00693] В одном из вариантов осуществления способ представляет собой in vitro или ex vivo способ.

[00694] В некоторых вариантах осуществления любой из этапов (a)-(f) включает один или более признаков, раскрытых в настоящем документе, например, один или более признаков, раскрытых под заголовками «ЭТАП A: Получение образца опухоли пациента», «ЭТАП B: Первое размножение», «ЭТАП C: Переход от первого размножения ко второму размножению», «ЭТАП D: «Втрое размножение», «ЭТАП E: Сбор ОИЛ» и «ЭТАП F: Окончательное формулирование/перенос в инфузионный мешок».

[00695] В некоторых вариантах осуществления этап (g) включает один или более признаков, раскрытых в настоящем документе, например, один или более признаков, раскрытых под заголовком «ЭТАП H: Необязательное криоконсервирование ОИЛ». В некоторых вариантах осуществления этап (h) включает один или более признаков, раскрытых в настоящем документе, например, один или более признаков, раскрытых под заголовком «ЭТАП F:1 Фармацевтические композиции, дозы и режимы дозирования».

[00696] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

[00697] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

[00698] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки

(АПК) представляют собой МКПК.

[00699] В некоторых вариантах осуществления МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

[00700] В некоторых вариантах осуществления перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

[00701] В некоторых вариантах осуществления предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для использования в лечении рака в сочетании с режимом немиелоаблативной лимфодеплеции. В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют перед введением терапевтической популяции опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ).

[00702] В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[00703] В некоторых вариантах осуществления этап лечения пациента с применением режима введения высоких доз IL-2 начинают на следующий день после введения клеток ОИЛ пациенту на этапе (h).

[00704] В некоторых вариантах осуществления предложена терапевтическая популяция опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для использования в лечении рака в сочетании с режимом введения высоких доз IL-2. В некоторых вариантах осуществления режим введения высоких доз IL-2 начинают на следующий день после введения терапевтической популяции клеток ОИЛ.

[00705] 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.

[00706] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00707] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00708] Настоящее изобретение также относится к способу размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающему:

(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, с получением 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 (a) к этапу (b) происходит без открывания системы;

(c) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом второе размножение проводят в закрытом контейнере, имеющем вторую газопроницаемую поверхность, и при этом переход от этапа (b) к этапу (c) происходит без открывания системы;

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

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

[00709] В некоторых вариантах осуществления терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

[00710] В некоторых вариантах осуществления количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

[00711] В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования.

[00712] В некоторых вариантах осуществления способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды CS10.

[00713] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака, включающему введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), который 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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

при этом не проводят отбор популяций ОИЛ ни на одном из этапов (a)-(h). В одном из вариантов осуществления не проводят отбор второй популяции ОИЛ (пре-ПБР популяции) на основе фенотипа перед проведением второго размножения на этапе (d). В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основе экспрессии CD8 ни на одном из этапов этапы (a)-(h).

[00714] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, страдающего от рака, включающему введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), который 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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением третьей популяции ОИЛ, при этом третья популяция ОИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

(g) криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ из этапа (f), с использованием способа криоконсервирования, при этом способ криоконсервирования включает смешивание среды для криоконсервирования с собранной популяцией ОИЛ;

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

при этом не проводят отбор популяций ОИЛ ни на одном из этапов (a)-(h). В одном из вариантов осуществления не проводят отбор второй популяции ОИЛ (пре-ПБР популяции) на основе фенотипа перед проведением второго размножения на этапе (d). В одном из вариантов осуществления не проводят отбор первой популяции ОИЛ, второй популяции ОИЛ, третьей популяции ОИЛ или собранной популяции ОИЛ на основе экспрессии CD8 ни на одном из этапов этапы (a)-(h). В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции применяют перед введением собранной популяции ОИЛ. В некоторых вариантах осуществления режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[00715] 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 (c).

[00716] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

[00717] В некоторых вариантах осуществления сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

[00718] В некоторых вариантах осуществления способ включает сбор клеток на этапе (d) с использованием системы обработки клеток LOVO, такой как система LOVO производства компании 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 случаях система обработки клеток может производить разделение, промывание, обмен жидкости, концентрирование клеток и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[00719] В некоторых вариантах осуществления опухолевые фрагменты представляют собой множество фрагментов и 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.

[00720] В некоторых вариантах осуществления множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента помещают в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см и помещены в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,1 см, 0,2 см, 0,3 см, 0,4 см, 0,5 см, 0,6 см, 0,7 см, 0,8 см, 0,9 см или 1 см и помещены в контейнер с объемом, эквивалентным объему G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,5 см и помещены в G-REX 100. В некоторых вариантах осуществления 4 фрагмента имеют диаметр примерно 0,5 см и помещены в контейнер с объемом, эквивалентным объему G-REX 100.

[00721] В некоторых вариантах осуществления среда для культивирования клеток

находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

[00722] В некоторых вариантах осуществления инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

[00723] 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. В некоторых вариантах осуществления каждый в отдельности из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 11 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 25 дней до примерно 30 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 25 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) проводят в течение 22 дней или менее. В некоторых вариантах осуществления этапы (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

[00724] 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.

[00725] В некоторых вариантах осуществления антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

[00726] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00727] В некоторых вариантах осуществления эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

[00728] В некоторых вариантах осуществления риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

[00729] В некоторых вариантах осуществления ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

[00730] В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 10. В некоторых вариантах осуществления закрытый контейнер представляет собой G-REX 100.

VI. Дополнительные иллюстративные варианты осуществления

1. 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, OKT-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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

3. Способ по п. 1, при этом способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

4. Способ по п. 1, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

5. Способ по п. 4, при этом МКПК являются облученными и аллогенными.

6. Способ по п. 4, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

7. Способ по п. 1, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

8. Способ по п. 1, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

9. Способ по п. 1, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

10. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

11. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 $мм^3$ до примерно 1500 $мм^3$.

12. Способ по п. 9, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

13. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

14. Способ по п. 1, при этом среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

15. Способ по п. 1, при этом среда для культивирования клеток на этапе (d) дополнительно содержит IL-15 и/или IL-21.

16. Способ по любому из предшествующий пунктов, при этом концентрация IL-2 составляет от примерно 10000 МЕ/мл до примерно 5000 МЕ/мл.

17. Способ по п. 15, при этом концентрация IL-15 составляет от примерно 500 МЕ/мл до примерно 100 МЕ/мл.

18. Способ по п. 1, при этом концентрация IL-21 составляет от примерно 20 МЕ/мл до примерно 0,5 МЕ/мл.

19. Способ по п. 1, при этом инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

20. Способ по п. 3, при этом среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

21. Способ по п. 17, при этом среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% ДМСО.

22. Способ по п. 1, 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.

23. Способ по п. 1, при этом каждый в отдельности из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

24. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

25. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

26. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 15 дней до примерно 20 дней.

27. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от

примерно 10 дней до примерно 20 дней.

28. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

29. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее.

30. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 20 дней или менее.

31. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 15 дней или менее.

32. Способ по п. 1, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 10 дней или менее.

33. Способ по п. 2, при этом этапы (a) - (f) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

34. Способ по любому из пунктов 1-33, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

35. Способ по п. 34, при этом количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

36. Способ по любому из пунктов 1-35, при этом этапы (b) - (e) проводят в одном контейнере, и при этом проведение этапов (b) - (e) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль по сравнению с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

37. Способ по любому из пунктов 1-36, при этом антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

38. Способ по любому из пунктов 1-37, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенной эффективностью, повышенным продуцированием интерферона-гамма, повышенной поликлональностью, повышенным средним уровнем IP-10 и/или повышенным средним уровнем MCP-1 при введении субъекту.

39. Способ по любому из пунктов 1-38, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенным по меньшей мере в пять раз, или более, продуцированием интерферона-гамма при введении субъекту.

40. Способ по любому из пунктов 1-39, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

41. Способ по любому из пунктов 1-40, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из

второй популяции клеток.

42. Способ по любому из пунктов 1-41, при этом риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

43. Способ по любому из пунктов 1-42, при этом ОИЛ из этапа (g) вводят инфузией пациенту.

44. Способ по любому из пунктов 1-43, при этом множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

45. Способ лечения субъекта, страдающего от рака, включающий введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) и включающий:

(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, 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

46. Способ по п. 45, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

47. Способ по п. 46, при этом количество ОИЛ, достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

48. Способ по п. 47, при этом антигенпредставляющие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

49. Способ по п. 48, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

50. Способ по любому из пунктов 45-49, при этом перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

51. Способ по п. 50, при этом режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

52. Способ по любому из пунктов 45-51, дополнительно включающий этап лечения пациента с применением режима высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения клеток ОИЛ пациенту на этапе (h).

53. Способ по п. 52, при этом режим высоких доз IL-2 включает введение 600000 или 720000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

55. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом 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.

57. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом рак выбирают из

группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки и НМРЛ.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом рак представляет собой меланому.

59. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом рак представляет собой ПКГШ.

60. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом рак представляет собой рак шейки матки.

61. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом рак представляет собой НМРЛ.

62. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(a) добавление 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, с получением 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 (a) к этапу (b) происходит без открывания системы;

(c) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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 (c) происходит без открывания системы;

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

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

63. Способ по п. 62, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

64. Способ по п. 63, при этом количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

65. Способ по п. 64, дополнительно включающий этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования.

66. Способ по п. 65, при этом способ криоконсервирования применяют с

использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

67. Способ по п. 62, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

68. Способ по п. 67, при этом МКПК являются облученными и аллогенными.

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

70. Способ по п. 62, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

71. Способ по п. 62, при этом сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

72. Способ по п. 62, при этом множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

73. Способ по п. 62, при этом множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 $мм^3$ до примерно 1500 $мм^3$.

74. Способ по п. 63, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

75. Способ по п. 62, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

76. Способ по п. 62, при этом множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

77. Способ по п. 62, при этом вторая среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

78. Способ по п. 62, при этом инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

79. Способ по п. 62, при этом 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.

80. Способ по п. 62, при этом каждый в отдельности из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 11 дней.

81. Способ по п. 62, при этом этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

82. Способ по п. 62, при этом этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

83. Способ по п. 62, при этом этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

84. Способ по п. 62, при этом этапы (a) - (e) проводят в течение 22 дней или менее.

85. Способ по п. 65, при этом этапы (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

86. Способ по любому из пунктов 62-85, при этом этапы (b) - (e) проводят в одном

контейнере, и при этом проведение этапов (b) - (e) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль по сравнению с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

87. Способ по любому из пунктов 62-86, при этом антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

88. Способ по любому из пунктов 62-87, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

89. Способ по любому из пунктов 62-88, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

90. Способ по любому из пунктов 62-89, при этом риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

91. Способ по любому из пунктов 62-90, при этом ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

92. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор.

93. Способ по п. 92, при этом закрытый контейнер представляет собой G-REX 10.

94. Способ по п. 92, при этом закрытый контейнер представляет собой G-REX 100.

95. Способ по любому из пунктов 1-61, при этом на этапе (d) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

96. Способ по п. 95, при этом культура клеток имеет соотношение, составляющее $2{,}5\times10^9$ АПК к 100×10^6 ОИЛ.

97. Способ по любому из пунктов 62-94, при этом на этапе (c) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

98. Способ по п. 97, при этом культура клеток имеет соотношение, составляющее $2{,}5\times10^9$ АПК к 100×10^6 ОИЛ.

99. 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 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, с получением 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, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

100. Популяция ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, по п. 99, при этом способ дополнительно включает один или более признаков, перечисленных в любом из пунктов 1-99.

101. 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), 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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), а также антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

102. Способ по п. 101, дополнительно включающий этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, из этапа (f) с использованием способа криоконсервирования.

103. Способ по п. 101, при этом способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

104. Способ по п. 101, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

105. Способ по п. 104, при этом МКПК являются облученными и аллогенными.

106. Способ по п. 104, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

107. Способ по п. 101, при этом антигенпредставляющие клетки представляют собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

108. Способ по п. 101, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием мембранной системы обработки клеток.

109. Способ по п. 101, при этом сбор клеток на этапе (e) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

110. Способ по п. 101, при этом множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

111. Способ по п. 101, при этом множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 $мм^3$ до примерно 1500 $мм^3$.

112. Способ по п. 109, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

113. Способ по п. 101, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

114. Способ по п. 101, при этом вторая среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

115. Способ по п. 101, при этом среда для культивирования клеток на этапе (d) дополнительно содержит IL-15 и/или IL-21.

116. Способ по любому из пунктов 101-115, при этом концентрация IL-2 составляет от примерно 10000 МЕ/мл до примерно 5000 МЕ/мл.

117. Способ по п. 115, при этом концентрация IL-15 составляет от примерно 500 МЕ/мл до примерно 100 МЕ/мл.

118. Способ по п. 101, при этом концентрация IL-21 составляет от примерно 20 МЕ/мл до примерно 0,5 МЕ/мл.

119. Способ по п. 101, при этом инфузионный мешок на этапе (f) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

120. Способ по п. 103, при этом среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

121. Способ по п. 117, при этом среда для криоконсервирования содержит от 7% до 10% ДМСО.

122. Способ по п. 101, при этом каждый из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

123. Способ по п. 101, при этом каждый из первого периода на этапе (c) и второго периода на этапе (e) проводят в течение 11 дней.

124. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

125. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 20 дней до примерно 22 дней.

126. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 15 дней до примерно 20 дней.

127. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

128. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

129. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 22 дней или менее.

130. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 20 дней или менее.

131. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 15 дней или менее.

132. Способ по п. 101, при этом этапы (a) - (f) проводят в течение 10 дней или

менее.

133. Способ по п. 102, при этом этапы (a) - (f) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

134. Способ по любому из пунктов 101-133, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

135. Способ по п. 134, при этом количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

136. Способ по любому из пунктов 101-135, при этом этапы (b) - (e) проводят в одном контейнере, и при этом проведение этапов (b) - (e) в одном контейнере приводит к увеличению выхода ОИЛ в расчете на каждую резецированную опухоль по сравнению с проведением этапов (b) - (e) в более чем одном контейнере.

137. Способ по любому из пунктов 101-136, при этом агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) представляет собой анти-4-1BB антитело.

138. Способ по любому из пунктов 101-137, при этом антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (d) без открывания системы.

139. Способ по любому из пунктов 101-138, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенной активностью, повышенным продуцированием интерферона-гамма, повышенной поликлональностью, повышенным средним уровнем IP-10 и/или повышенным средним уровнем MCP-1 при введении субъекту.

140. Способ по любому из пунктов 101-139, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) отличается повышенным по меньшей мере в пять раз или более продуцированием интерферона-гамма при введении субъекту.

141. Способ по любому из пунктов 101-140, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

142. Способ по любому из пунктов 101-141, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из третьей популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

143. Способ по любому из пунктов 101-142, при этом риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

144. Способ по любому из пунктов 101-143, при этом ОИЛ из этапа (g) вводят

инфузией пациенту.

145. Способ по любому из пунктов 101-144, при этом множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

146. Способ лечения субъекта, страдающего от рака, включающий введение размноженных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ), включающий:

(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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), 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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и, необязательно, агониста суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), а также антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

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

147. Способ по п. 146, при этом терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (e), содержит достаточное количество ОИЛ для введения терапевтически эффективной дозы ОИЛ на этапе (h).

148. Способ по п. 147, при этом количество ОИЛ, достаточное для введения

терапевтически эффективной дозы на этапе (h), составляет от примерно $2,3\times10^{10}$ до примерно $13,7\times10^{10}$.

149. Способ по п. 148, при этом антигенпредставляющие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

150. Способ по п. 149, при этом МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (d).

151. Способ по любому из пунктов 146-150, при этом агонист суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF) представляет собой анти-4-1BB антитело.

152. Способ по любому из пунктов 146-151, при этом перед введением терапевтически эффективной дозы клеток ОИЛ на этапе (h) было проведено лечение пациента с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции.

153. Способ по п. 152, при этом режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

154. Способ по любому из пунктов 146-153, дополнительно включающий этап лечения пациента с применением режима введения высоких доз IL-2, начиная на следующий день после введения клеток ОИЛ пациенту на этапе (h).

155. Способ по п. 154, при этом 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.

156. Способ по любому из пунктов 146-155, при этом третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетки, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

157. Способ по любому из пунктов 146-156, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ОИЛ демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

158. Способ по любому из пунктов 146-157, при этом 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.

159. Способ по любому из пунктов 146-158, при этом рак выбирают из группы, состоящей из меланомы, ПКГШ, рака шейки матки и НМРЛ.

160. Способ по любому из пунктов 146-159, при этом рак представляет собой меланому.

161. Способ по любому из пунктов 146-160, при этом рак представляет собой ПКГШ.

162. Способ по любому из пунктов 146-161, при этом рак представляет собой рак шейки матки.

163. Способ по любому из пунктов 146-162, при этом рак представляет собой НМРЛ.

164. Композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ОИЛ по любому из предшествующих пунктов, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов.

165. Композиция для криоконсервирования по п. 164, дополнительно содержащая один или более стабилизаторов и один или более факторов роста лимфоцитов.

166. Композиция для криоконсервирования по п. 165, при этом один или более стабилизаторов включают человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), и один или более факторов роста лимфоцитов включают IL-2.

167. Композиция для криоконсервирования по п. 166, необязательно, содержащая ОКТ-3.

168. Композиция для криоконсервирования по п. 164, при этом криопротекторная среда, содержащая ДМСО, и раствор электролитов присутствуют в соотношении от примерно 1,1:1 до примерно 1:1,1.

169. Композиция для криоконсервирования по п. 168, при этом криопротекторная среда, содержащая ДМСО, и раствор электролитов присутствуют в соотношении примерно 1:1.

170. Композиция для криоконсервирования по п. 164, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^6 до примерно 9×10^{14}; криопротекторную среду, содержащую ДМСО, в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,1 г до примерно 1,0 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,005 мг.

171. Композиция для криоконсервирования по п. 164, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

172. Композиция для криоконсервирования по п. 164, при этом 100 мл композиции состоят преимущественно из популяции ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до

примерно 1×10^{11}; криопротекторной среды в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствора электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

173. Композиция для криоконсервирования по п. 164, предназначенная для использования в лечении субъекта, страдающего от рака.

174. Композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ОИЛ, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^{7} до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

175. Композиция для криоконсервирования, состоящая преимущественно из популяции ОИЛ, криопротекторной среды, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО), и раствора электролитов, при этом 100 мл композиции состоят преимущественно из популяции ОИЛ в количестве от примерно 1×10^{7} до примерно 1×10^{11}; криопротекторной среды в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствора электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

176. Инфузионный мешок, содержащий композицию для криоконсервирования по любому из пунктов 164-175.

177. Инфузионный мешок по п. 176, представляющий собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

178. Мешок для хранения, содержащий композицию для криоконсервирования по любому из пунктов 164-175.

179. Мешок для хранения по п. 178, представляющий собой мешок для заморозки CryoStore CS750.

ПРИМЕРЫ

[00731] 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

[00732] Как описано в настоящем документе, были разработаны протоколы и анализы для получения ОИЛ из опухолей пациентов в закрытой системе.

[00733] 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.

Определения/Сокращения

ББЗ - бокс биологической безопасности

°C – градусы Цельсия

CO_2 – диоксид углерода

CD3 – кластер дифференцировки 3

CM1 – полная среда 1

CM2 – полная среда 2

TIWB – промывающий буфер для выделения опухоли

CM4 – полная среда 4

CRF – морозильная камера с регулируемой скоростью заморозки

EtOH - этанол

GMP – Надлежащая производственная практика

IL-2, rIL-2 – интерлейкин-2, рекомбинантный человеческий интерлейкин-2

ME – международные единицы

л - литр

LN_2 – жидкий азот

мл - миллилитр

мкл - микролитр

мМ - миллимолярный

мкм - микрометр

Н/П – не применимо

МКПК – мононуклеарные клетки периферической крови

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

Пре-ПБР – исходные культуры ОИЛ, происходящие из опухолевых фрагментов

ПБР – протокол быстрого размножения

ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

TIWB – промывающий буфер для выделения ОИЛ

СОП – стандартная операционная процедура.

Процедура

1. Предварительная подготовка: День 0 (выполняют до 36 часов ранее)

1.1 Готовят 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 переносят 2,5 мл в HBSS. Из маточного 50 мг/мл раствора переносят 0,5 мл в HBSS.

1.2. Готовят среду CM1 с GlutaMax™ в соответствии с LAB-005 «Приготовление среды для пре-ПБР и ПБР» из инструкций для CM2». Хранят при 4°C до 24 часов. Оставляют нагреваться до 37°C в течение по меньшей мере 1 часа перед использованием.

1.3. Извлекают аликвоту(ы) IL-2 из морозильной камеры на -20°C и помещают аликвоту(ы) в холодильник на 2-8°C.

2. Получение опухолевой ткани

2.1. Сохраняют все документы, полученные с опухолевой тканью, фотографируют транспортный контейнер и опухолевую ткань.

2.2. В случае предоставления TempTale распечатывают и сохраняют связанный документ; сохраняют PDF версию.

2.3. Извлекают образец опухоли и вторичный контейнер (пакет с застежкой-молнией) из транспортной тары и хранят при 4°C до обработки.

2.4 Отправляют неиспользованную опухоль либо в HypoThermasol, либо в виде замороженных фрагментов в CryoStor CS10 (обе среды коммерчески доступны от BioLife Solutions, Inc.).

3. Обработка опухоли для получения ОИЛ

3.1. Асептически переносят следующие материалы в ББВ, по мере необходимости, и маркируют в соответствии с Таблицей 3, ниже.

ТАБЛИЦА 3. 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

3.2. Маркируют кружки на чашках для опухолевых фрагментов буквами A-J.

3.3. Маркируют нижнюю поверхность лунок чашек для подходящей ткани буквами A–J.

3.4. Переносят 5 мл гентамицина в бутылку с HBSS. Маркируют TIWB.

3.5. Вращают для перемешивания.

3.6. Переносят пипеткой 50 мл TIWB в каждую из следующих чашек:

1. Чашка для промывания 1

2. Чашка для промывания 2

3. Чашка для промывания 3

4. Чашка для промывания 4

3.7. Переносят пипеткой 2 мл TIWB в лунки A-J чашки для подходящей ткани.

3.8. Накрывают чашку для подходящей ткани (нижняя часть 6-луночного планшета) соответствующей чашкой для опухолевых фрагментов (крышка 6-луночного планшета).

3.9. Используя длинный пинцет, извлекают опухоль(и) из флакона для образцов и переносят в чашку для промывания 1.

3.10. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 1 в течение 3 минут.

3.11. В процессе инкубации заново маркируют флакон для образцов «Биомасса» и хранят при 2-8°C для передачи в отдел Контроля качества для тестирования.

3.12. Откладывают длинный пинцет и используют короткий пинцет для последующих манипуляций.

3.13. При помощи пинцета переносят опухоль в чашку для промывания 2.

3.14. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 2 в течение 3 минут.

3.15. При помощи пинцета переносят опухоль в чашку для промывания 3.

3.16. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 3 в течение 3 минут.

3.17. Снимают чашки для опухолевых фрагментов (крышки 6-луночных планшетов) с чашек для подходящей ткани (нижняя часть 6-луночных планшетов) и помещают чашки для опухолевых фрагментов в перевернутом состоянии на поверхность в ББВ.

3.18. Используя пипетку для переноса, добавляют примерно 4 расположенные с равными промежутками отдельные капли TIWB в каждый кружок чашек для опухолевых фрагментов.

3.19. Помещают линейку под чашку для измельчения.

3.20. При помощи пинцета переносят опухоль в чашку для измельчения.

3.21. При помощи линейки под чашкой для измельчения измеряют и записывают длину опухоли.

3.22. Для опухолей, превышающих 1 см, готовят дополнительные чашки для подходящей ткани.

3.23. Проводят начальное измельчение кусков опухоли в чашке для измельчения на 10 промежуточных кусков и принимают меры для сохранения опухолевой структуры

каждого промежуточного куска.

3.24. Переносят любые промежуточные куски опухоли, не измельчаемые активно на фрагменты, в чашку для промывания 4 для гарантии того, что ткань остается гидратированной на протяжении всей процедуры измельчения.

3.25. Работая каждый раз с одним промежуточным куском опухоли, тщательно нарезают опухоль на фрагменты размером до 3x3x3 мм в чашке для измельчения, сверяясь с линейкой, находящейся под чашкой. Затупившийся скальпель заменяют новым скальпелем.

3.26. Продолжают измельчение на фрагменты промежуточных кусков опухоли до тех пор, когда будет измельчена вся ткань промежуточных кусков.

3.27. Выбирают подходящие фрагменты и при помощи пипетки для переноса переносят до 4 подходящих фрагментов в капли TIWB в одном кружке чашки для опухолевых фрагментов.

3.28. При помощи пипетки для переноса переносят любые оставшиеся подходящие фрагменты из куска опухоли, в случае их наличия, в соответствующую лунку в чашке для подходящей ткани.

3.29. При помощи пипетки для переноса переносят максимально возможное количество неподходящей ткани и отходов в чашку для неподходящей ткани, чтобы очистить чашку для измельчения. Неподходящая ткань содержит желтую жировую ткань или некротическую ткань.

3.30. Продолжают обработку, повторяя этапы 7.3.25-7.3.30 для остальных промежуточных кусков опухоли, обрабатывая по одному промежуточному куску за раз, до завершения обработки всей опухоли.

3.31. Если менее 4 опухолевых фрагментов доступны для помещения в соответствующий кружок чашки для опухолевых фрагментов, можно использовать фрагменты из не соответствующей лунки чашки для подходящей ткани, по мере возможности, для достижения цели получения 40 фрагментов. Если имеется менее 40 фрагментов, 10-40 помещают в один флакон G-REX 100M.

4. Засевание флакона G-REX 100M

4.1. Асептически переносят следующие материалы в ББВ, по мере необходимости, и маркируют в соответствии с Таблицей 4, ниже.

ТАБЛИЦА 4. Дополнительные материалы для засеваемых флаконов.

Наименование	Минимальное количество	Маркировка в ходе процесса
Флакон G-REX 100M	По мере необходимости	Лот №
Теплая CM1	По мере необходимости	Лот №
Аликвоты IL-2	По мере необходимости	Лот №

4.2. Добавляют на каждый литр CM1 1 мл маточного раствора IL-2 (6×10^6 МЕ/мл).

4.3. Помещают 1000 мл предварительно нагретой CM1, содержащей 6000 МЕ/мл IL-2, в каждый нужный биореактор G-REX 100M в соответствии с Таблицей 5, ниже.

4.4. При помощи пипетки для переноса переносят соответствующее число опухолевых фрагментов в каждый флакон G-REX 100M, распределяя фрагменты в соответствии с Таблицей 5.

4.5. Если один или более опухолевых фрагментов, перенесенных во флакон G-REX 100M, всплывают, отбирают один дополнительный опухолевый фрагмент, при наличии, из чашки для подходящей ткани и переносят его во флакон G-REX 100M.

4.6. Записывают общее число фрагментов, добавленных в каждый флакон.

4.7. Отбрасывают чашку для неподходящей ткани.

4.8. Помещают каждый биореактор G–REX 100M в инкубатор при 37°C, 5% CO_2.

4.9. Если доступно более 40 фрагментов:

4.9.1. Если получено >41 фрагмента, помещают 1000 мл предварительно нагретой полной среды CM1 во второй биореактор G-REX 100M.

ТАБЛИЦА 5. Необходимое число биореакторов G-REX

Число фрагментов	**G-REX**	**Число G-REX**	**Необходимое количество CM1**
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		

5. Предварительная подготовка: День 11 (выполняют до 24 часов ранее)

5.1. Готовят 6 л CM2 с GlutaMax. Используют для справки лабораторные документы «Приготовление среды для пре-ПБР и ПБР» из инструкций для CM2». Нагревают до 37°C за 1 час до использования.

5.2. Размораживают аликвоты IL-2: извлекают аликвоты IL-2 из морозильной камеры и оставляют при 4°C.

6. Сбор ОИЛ (День 11).

6.1. Осторожно извлекают флаконы G-REX 100M из инкубатора и помещают в БББ2. Проявляют осторожность, чтобы не потревожить клетки на дне флакона.

6.2. Используя GatherRex или перистальтический насос, проводят аспирацию ~900 мл супернатанта среды для культивирования клеток из флакона(ов).

6.3. Ресуспендируют ОИЛ, осторожно вращая флакон. Контролируют, чтобы все клетки вышли из оболочки.

6.4. Используя перистальтический насос или GatherRex, переносят оставшуюся клеточную суспензию в соответствующего размера пакет для переноса (300-1000 мл). Проявляют осторожность, чтобы фрагменты не были перенесены в пакет для переноса.

6.5. Прокалывают пакет для переноса 4” инструментом из набора для переливания плазмы (следует убедиться, что зажим закрыт).

6.6. Разминают пакет для гарантии тщательного перемешивания клеточной суспензии и, используя 3-мл шприц, отбирают 1 мл суспензии ОИЛ для подсчета клеток. Зажимают трубку и повторно накрывают канюлю Люэра новым стерильным колпачком Люэра.

6.7. Помещают мешок для переноса во внешний пластиковый пакет на молнии и вновь помещают в инкубатор до использования.

7. Приготовление среды

7.1. Оставляют среду нагреваться до 37°C в течение >1 часа.

7.2. Добавляют 3 мл маточного $6x10^6$ МЕ/мл раствора rhIL-2 к 6 л CM2 для достижения конечной концентрации 3000 МЕ/мл rhIL-2. Маркируют «Полная среда CM2».

7.3. Стерильно соединяют сваркой 4” набор для переливания плазмы с канюлей Люэра с 1-л пакетом для переноса.

7.4. Переносят 500 мл полной среды CM2 в 1-л пакет для переноса. Отсоединяют набор для переноса жидкости или шприц и присоединяют стерильный наконечник Люэра к порту канюли Люэра.

7.5. Вводят в пакет соединительное устройство для отбора проб.

7.6. Используя 1,0-мл шприц с иглой, отбирают до 150 мкл 1 мг/мл анти-CD3 (клон OKT3) и переносят в 500 мл «полной среды CM2» через устройство для отбора проб. Оттягивают шприц назад, чтобы убедиться, что реагент полностью смыт. Хранят при 37°C до использования.

8. Подготовка флакона

8.1. Переносят 4,5 л «полной среды CM2» во флакон G-REX 500M, сверяясь с градуировкой на флаконе.

8.2. Помещают флакон в инкубатор при 37°C до готовности.

9. Размораживание облученных питающих клеток

9.1. Используют $5,0\times10^9$ аллогенных облученных питающих клеток от двух или более доноров.

9.2. Извлекают питающие клетки из морозильной камеры с LN2 и помещают в сумку для переноса биологически опасных веществ.

9.3. С пакетами, содержащими питающие клетки, в сумке для переноса биологически опасных веществ размораживают питающие клетки в инкубаторе при 37°C или в бане с гранулами. Удерживают пакеты в неподвижном и погруженном состоянии. Извлекают питающие клетки из бани, когда они почти полностью разморожены, но все еще холодные.

9.4. Опрыскивают или протирают пакеты с питающими клетками 70% EtOH и помещают в БББ2. Добавляют каждый пакет с питающими клетками непосредственно в открытый G-Rex 500M для гарантии достаточного количества облученных клеток ($5x10^9$ клеток, ± 20%).

9.5. Закрывают оба зажима на Y-образном коннекторе конусом Люэра.

9.6. Вводят в каждый пакет с питающими клетками колено Y-образного коннектора.

9.7. Извлекают 1-л пакет для переноса с 500 мл «полной среды CM2» + OKT3 и переносят в БББ.

9.8. Асептически присоединяют 60-мл шприц к 3-стороннему запорному клапану, и асептически присоединяют пакет для переноса к входящему концу запорного клапана.

9.9. Асептически присоединяют Y-образный коннектор к 3-стороннему запорному клапану.

9.10. Отбирают все содержимое пакетов с питающими клетками в шприц, записывают объем, и вносят $5{,}0\times10^9$ аллогенных облученных питающих клеток в пакет для переноса.

9.11. Зажимают и отсоединяют пакет для переноса от аппарата, и закрывают канюлю Люэра новым стерильным наконечником Люэра.

9.12. Используя иглу и 3-мл шприц, отбирают 1 мл для подсчета клеток из устройства для отбора проб.

9.13. Если достигнуто целевое количество клеток ± 10% ($5{,}0\times10^9$) с жизнеспособностью >70%, продолжают действия.

9.14. Если достигнуто менее 90% от целевого количества клеток ($5{,}0\times10^9$) с жизнеспособностью >70%, размораживают другой пакет и повторяют действия 7.9.4-7.9.12. Если достигнуто более 110% от целевого количества клеток, рассчитывают надлежащий объем, необходимый для нужной дозы клеток, и продолжают действия.

10. Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток во флаконе G-REX 500M.

10.1. Извлекают флакон G-REX 500M, содержащий приготовленную среду, из инкубатора и помещают в ББВ2.

10.2. Соединяют пакет для переноса с питающими клетками с G-REX 500M и позволяют содержимому пакета перетекать в 500M.

10.3. Извлекают суспензию ОИЛ из инкубатора и помещают в ББВ.

10.4. Рассчитывают объем суспензии ОИЛ, который должен быть добавлен для достижения общего количества 200×10^6 жизнеспособных клеток.

*(ОКЖК/мл) / 200*x$10^{6=}$*мл*

10.5. Если ОИЛ содержат всего $5\text{-}200\times10^6$ жизнеспособных клеток, добавляют все ОИЛ (весь объем) в G-REX 500M. Если в ОИЛ общее количество жизнеспособных клеток превышает 200×10^6, добавляют рассчитанный объем, необходимый для распределения 200×10^6 ОИЛ в отдельный флакон G-REX 500M. Оставшиеся ОИЛ осаждают центрифугированием и замораживают в по меньшей мере двух криопробирках при плотности 10^8/мл в CS10, маркируют названием ОИЛ и датой заморозки.

10.6. Помещают G-REX 500M в инкубатор при 37°C, 5% CO_2, на 5 дней.

11. Предварительная подготовка: день 16-18

11.1. Нагревают 1 10-л мешок AIM-V для культур, инициированных менее 50×10^6

ОИЛ, нагревают 2 для культур, содержащих более 50×10^6 ОИЛ, при 37°C в течение по меньшей мере 1 часа или до готовности к использованию.

12. Проведение подсчета клеток ОИЛ: день 16-18

12.1. Извлекают флакон G-REX 500M из инкубатора и помещают в ББВ2. Проявляют осторожность, чтобы не потревожить культуру клеток на дне флакона.

12.2. Асептически отбирают 4 л среды для культивирования клеток из флакона G-REX 500M и помещают в стерильный контейнер.

12.3. Вращают G-REX 500M до тех пор, когда все ОИЛ переходят в суспензию с мембраны.

12.4. Используя GatherRex или перистальтический насос, переносят клеточную суспензию в 2-л пакет для переноса. Оставляют флакон 500M для последующего использования. Герметично закрывают порт устройства для отбора проб во избежание потерь ОИЛ.

12.5. Вводят в пакет для переноса устройство для отбора проб и, используя 3-мл шприц и иглу, отбирают 2×1 мл независимых образца для подсчета клеток.

12.6. Рассчитывают общее количество флаконов, необходимых для субкультивирования, по следующей формуле. Округляют значения в большую сторону.

*Общее количество жизнеспособных клеток/1,0*x10^9*=количество флаконов*

13. Приготовление CM4

13.1. Готовят 10-л мешок AIM-V для каждых двух флаконов 500M. При необходимости, нагревают дополнительную среду.

13.2. Для каждой необходимой 10-л AIM-V добавляют 100 мл GlutaMAX, получая CM4.

13.3. Добавляют в среду CM4 rhIL-2 до конечной концентрации 3000 МЕ/мл rhIL-2.

14. Разделение клеточной культуры

14.1. Используя градуировку на флаконе, самотеком наполняют каждый флакон G-REX 500M до 5 л.

14.2. Поровну распределяют объем ОИЛ среди рассчитанного количества G-REX 500M.

14.3. Помещают флаконы в инкубатор при 37°C, 5% CO_2, до сбора клеток в день 22 ПБР.

15. Предварительная подготовка: день 22-24

15.1. Готовят 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. Объединяют в вспомогательном мешке LOVO.

15.2. Добавляют 200 мл CS10 с IL-2 в концентрации 600 МЕ/мл.

15.3. Предварительно охлаждают четыре 750-мл алюминиевых емкости для морозильной камеры при 4°C.

16. Сбор ОИЛ: день 22-24

16.1. Извлекают флаконы G-REX 500M из инкубатора с 37°C и помещают в ББВ2.

Проявляют осторожность, чтобы не потревожить культуру клеток на дне флакона.

16.2. Удаляют аспирацией и отбрасывают 4,5 л супернатанта среды для культивирования клеток из каждого флакона.

16.3. Вращают флакон G-REX 500M для полного ресуспендирования ОИЛ.

16.4. Взвешивают 3-5-л мешок для проведения биопроцессов перед использованием.

16.5. Используя GatherRex или перистальтический насос, собирают ОИЛ в мешок для проведения биопроцессов.

16.6. Тщательно перемешивают содержимое мешка и, используя 3-мл шприц, отбирают 2×2 мл образца через порт для отбора образцов шприцем для подсчета клеток.

16.7. Взвешивают мешок и определяют разницу между начальной и конечной массой. Используют следующую формулу для расчета объема клеточной суспензии.

Масса-нетто клеточной суспензии (мл) / 1,03=объем (мл)

17. Фильтрование ОИЛ и приготовление исходного мешка LOVO

17.1. Помещают мешок, содержащий клеточную культуру, в ББББ2.

17.2. Помещают 170-мкм фильтр для крови в ББББ2 и закрывают все зажимы.

17.3. Стерильно соединяют сваркой исходное колено фильтра с клеточной суспензией.

17.4. Взвешивают новый мешок для проведения биопроцессов соответствующего размера (его называют исходным мешком LOVO).

17.5. Стерильно соединяют сваркой наконечник фильтра с исходным мешком LOVO.

17.6. Поднимают вверх клеточную суспензию, вешая мешок с клетками на штатив для внутривенных вливаний, для переноса клеток под действием силы тяжести.

Примечание: (Нельзя допускать, чтобы исходный мешок свисал с фильтровального аппарата.)

17.7. Открывают все необходимые зажимы и позволяют ОИЛ перетекать из мешка с клеточной суспензией через фильтр и в исходный мешок LOVO.

17.8. После того, как все клетки будут перенесены в исходный мешок LOVO, закрывают все зажимы и герметично закрывают трубку исходного мешка LOVO, удаляя фильтр.

17.9. Взвешивают исходный мешок LOVO и рассчитывают объем.

17.10. Исходный мешок LOVO готов для LOVO.

17.11. Отделяют мешок для конечного препарата LOVO от одноразового набора, герметично перекрывая трубку вблизи мешка.

18. Формулирование ОИЛ в соотношении 1:1 в холодной среде CS10, содержащей 600 МЕ/мл rhIL-2.

18.1. Рассчитывают необходимое количество криомешков.

(объем клеточного препаратах2) / 100=необходимое количество мешков (округляют в меньшую сторону)

18.2. Рассчитывают объем, распределяемый в каждый мешок.

(объем клеточного препаратах2) / необходимое количество мешков=объем, добавляемый в каждый мешок

18.3. Асептически переносят следующие материалы, перечисленные в Таблице 6, в ББВ.

ТАБЛИЦА 6. 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 МЕ/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

19. Формулирование ОИЛ

19.1. Закрывают все зажимы на соединительном устройстве для клеток CC1.

19.2. К соединительному устройству для клеток асептически присоединяют мешок для конечного препарата LOVO, наконечник Люэра мешка с CS10 и соответствующее количество криомешков. Заменяют 60-мл шприц 100-мл шприцем.

19.3. Необходимый объем CS10 эквивалентен объему мешка для конечного препарата LOVO.

19.4. Открывают путь через запорный клапан и снимают зажим с линии между мешком для конечного препарата LOVO и шприцем для набирания CS10 в шприц, вновь перекрывают путь CS10. Снимают зажим с пути в мешок для клеток для проталкивания CS10 в мешок для конечного препарата LOVO. Используют шприц для измерения объема, добавляемого в мешок для конечного препарата LOVO. Повторяют по мере необходимости, используя новый шприц до того момента, когда будет перенесено нужное количество CS10.

19.5. Перемешивают содержимое мешка для конечного препарата LOVO путем

переворачивания.

19.6. Возвращают на место 100-мл шприц.

19.7. Открывают зажимы на 750-мл криомешках по одному за раз.

19.8. Открывают только те зажимы, которые непосредственно связаны со сформулированным препаратом и используемым криомешком.

19.9. Используют 100-мл шприц для измерения объема сформулированного препарата, направляемого в криомешок.

19.10. Переносят 100 мл сформулированного препарата в каждый криомешок.

19.11. После добавления в каждый мешок оттягивают шприц назад для удаления всех воздушных пузырей из криомешков и вновь зажимают связанную линию.

19.12. Из последнего мешка отбирают 10 мл архивного образца для тестирования КК.

19.13. Герметично закрывают каждый криомешок, оставляя минимально возможную трубку.

19.14. Удаляют шприц, содержащий архивный образец, и переносят образец в 50-мл коническую пробирку; переносят 1,5 мл в отдельные криопробирки и замораживают в морозильной камере с регулируемой скоростью заморозки.

19.15. Переносят герметично закрытые мешки на 4°C на время изготовления этикеток.

19.16. К каждому криомешку прикрепляют этикетку с описанием препарата, указанием названия и даты, объема, количества и жизнеспособности клеток.

19.17. Помещают каждый криомешок в предварительно охлажденную алюминиевую емкость для морозильной камеры.

20. Криоконсервирование ОИЛ с использованием морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки (CRF)

20.1. Выполняют стандартную операционную процедуру для использования морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки.

20.2. После использования CRF хранят криомешки в жидком азоте (LN_2).

21. Определяют ожидаемые результаты и измеряют критерии приемлемости.

ПРИМЕР 2: Применение способа для 8 опухолей от пациентов

[00734] Способ, описанный в примере 1, применяли с использованием 8 опухолей от пациентов, получая 8 партий ОИЛ. Были получены хорошие показатели извлечения из культуры, жизнеспособности, количества клеток, $CD3^+$ (показатель содержания, %, Т-клеток) и секреции IFN-гамма (IFN-g или IFN-γ), как показано в Таблице 7, ниже, и на Фигурах 7-10.

ТАБЛИЦА 7. Результаты проверки идентификационных характеристик, активности и жизнеспособности/извлечения для способа примера 1.

IFN-g (пг/1e6 клеток/24 часа)	**CD3 (%)**	**Клеток/мл (жизнеспособные**	**% извлечени**	**% жизнеспособност**

					+нежизнеспособные)		я		и
							Свежие/Lovo		
M106IT	4570		95,3		1,27E+08		103	88,1	
M1062T	3921		99,7		1,65E+08		89	84,5	
M1063T	5587		98,7		1,51E+08		112	82,1	
M1064T	619		84,5		1,75E+08		83	86,8	
M1065T	1363		96,8		3,42E+07		128	76,4	
EPI100IT	4263		90,4		1,82E+08		92	77,9	
M1056T	6065		94,2		2,11E+08		85	84,8	
M1058T	1007		99		2,72E+08		89	87,5	

ПРИМЕР 3: Масштабируемость модифицированного способа для ОИЛ

[00735] Представленные в настоящем документе исследования проводили в лаборатории разработки производственных технологий (PD), и впоследствии проводили квалификационное испытание технологического процесса (PQ) с использованием технологических прогонов в чистых, соответствующих требованиям GMP, помещениях на предприятии-изготовителе. Было завершено три PQ/технологических прогона в чистых, соответствующих требованиям GMP, помещениях в соответствии с квалификационным протоколом, и документация на партии на основе результатов исследований PD представлена в настоящем документе. Критерии приемлемости для технологических прогонов были установлены перспективно. Исследование PQ дополнительно кратко изложено ниже, и результаты тестирования, полученные для технологических партий, приведены в следующих далее разделах.

[00736] Количество клеток, полученное при выполнении протокола, предваряющего быстрое размножение (пре-ПБР) культур, часто превосходило 100×10^6 жизнеспособных клеток. Кроме того, включение циклов замораживания-размораживания между этапами культивирования пре-ПБР и ПБР приводило к уменьшению выхода жизнеспособных клеток. За счет элиминации на протяжении процесса этапа криоконсервирования процесс ПБР можно было бы надежно и регулярно начинать с большего количества ОИЛ. Это изменение позволяет уменьшать продолжительность ПБР на количество дней, пропорциональное периодам удвоения клеток, до примерно 11 дней без оказания влияния на дозу клеток. Кроме того, уменьшение времени культивирования от активации до сбора клеток приводит к получению препарата, который в меньшей степени дифференцирован и потенциально лучше приспособлен для персистенции in vivo (Tran 2008).

[00737] В исследовании PD валидировали инициацию ПБР культивирования с использованием вплоть до 200×10^6 клеток с фиксированным количеством питающих

клеток. Затем оценивали оптимальное время для сбора ПБР культуры, которое, по оценкам, составляло 9-14 дней. Культуры высевали при соотношениях питающих клеток и ОИЛ в диапазоне от 100:1 до 25:1. Оптимальное время для сбора определяли путем определения общего количества клеток, жизнеспособности, иммунного фенотипа, потребления среды, анализа метаболитов, анализа интерлейкина-2 (IL-2) и функциональных анализов, описанных ниже.

[00738] Иммунофенотипирование клеток в конце периода ПБР культивирования проводили на основании маркеров, приведенных в Таблице 8, ниже. Оценивали фенотипическую активацию и состояние дифференциации клеток. Статистически значимые различия в фенотипе отсутствовали при всех экспериментальных условиях.

ТАБЛИЦА 8. Маркеры активации и дифференциации, анализируемые в процессе оптимизации культивирования.

Мишень	**Метка для обнаружения**	**Клон**
Панель 1		
TCRab (то есть, TCR α/β)	PE/Cy7	IP26
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1
CD28	PE	CD28,2
CD4	FITC	OKT4
CD27	APC-H7	M-T271
CD56	APC	N901
CD8a	PB	RPA-T8
Панель 2		
CD45RA	PE/Cy7	HI100
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
CCR7	PE	150503
CD8	FITC	HIT8
CD4	APC/Cy7	OKT4
CD38	APC	HB-7
HLA-DR	PB	L243
Панель 3		
CD137	PE/Cy7	4B4-1
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
Lag3	PE	3DS223H
CD8	FITC	HIT8
CD4	APCCy7	OKT4

PD1	APC	EH12,2H7
Tim-3	BV421	F38-2E2

[00739] Сокращения: PE/Cy7=тандемный конъюгат фикоэритрин:Cy-7; PerCP-Cy5.5=конъюгат перидинин-хлорофилл-белковый комплекс:CY5.5; PE=фикоэритрин; FITC=конъюгат с флуоресцеин изотиоцианатом; APC-H7=тандемный конъюгат аллофикоцианин:H7; APC=аллофикоцианин; PB=Pacific Blue™

[00740] Потребление среды и продуцирование метаболитов оставалось в допустимых пределах при всех протестированных условиях; и уровни IL-2 в культуральном супернатанте оставались выше 150 МЕ/мл (данные не представлены).

[00741] Уничтожение опухолевых клеток Т-клетками, как известно, опосредуется активацией Т-клеточного рецептора на эффекторной Т-клетке в ответ на пептиды, представленные на поверхности опухолевых клеток. Ex vivo размноженные Т-клетки должны сохранять способность к активации и пролиферации в ответ на активацию TCR, чтобы они сохранялись in vivo после инфузии и опосредовали регрессию опухоли.

[00742] Для оценки потенциала активации культивируемых клеток ОИЛ, собранные в разные моменты времени, реактивировали при помощи облученных аллогенных МКПК, нагруженных OKT3. Культуры ОИЛ собирали через 7 дней и анализировали на кратность увеличения количества. Результаты данного исследования приведены в Таблице 9.

ТАБЛИЦА 9. Сводные результаты: пролиферация пост-ПБР ОИЛ после повторного культивирования с нагруженными OKT3 аллогенными МКПК.

День сбора клеток	**Кратность увеличения количества**	**SD**	**P-значения (критерий Стьюдента)**
Эксперимент 1			
День 9	43	6,088	Н/П
День 10	48	3,105	Н/П
День 11	71	11,137	0,135
День 14	60	6,995	
Эксперимент 2			
День 9	44	6,276	Н/П
День 10	27	4,762	Н/П
День 11	72	18,795	0,045
День 14	41	7,050	
Эксперимент			

3			
День 9	54	5,810	Н/П
День 10	54	9,468	Н/П
День 11	65	1,674	0,071
День 14	50	8,541	

[00743] Данное исследование продемонстрировало, что возможность активации ОИЛ в данном анализе возрастала с каждым днем культивирования до дня 11 (сбор в дни 9–11). Клетки, собранные в день 11 модифицированного способа, функционировали аналогично контрольным ОИЛ, поддерживаемым в культуре в течение 14 дней, аналогично современному способу.

[00744] Данные исследования продемонстрировали масштабируемость модифицированного способа размножения ОИЛ и позволили установить приемлемый диапазон соотношения ОИЛ и питающих клеток при высевании. Кроме того, было обнаружено, что ростовые характеристики сохранялись до дня 14 культивирования, хотя условия культивирования оставались оптимальными до дня 11. Показано, что протестированные условия не оказывали поддающийся измерению эффект на фенотип ОИЛ. Клетки, собранные в день 11 ПБР культивирования, продемонстрировали наилучшую способность к ответу на реактивацию, при том, что условия культивирования клеток оставались в допустимых пределах. Эти изменения были приняты и валидированы в полном масштабе, с разделением культуры, происходящим в день 5, и сбором клеток в день 11.

[00745] Технологические прогоны были проведены в отделе разработки производственных технологий с целью приобретения опыта производства и тестирования препарата ОИЛ перед соответствующим требованиям GMP производством аутологичного препарата ОИЛ для введения пациентам. Для технологических прогонов использовали технологию производства в таком же масштабе, который будет использован при GMP производстве препарата ОИЛ. Опыт выращивания ОИЛ из опухолей разных видов, включая метастазы меланомы, рака молочной железы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКГШ), карциномы шейки матки и рака легкого, показал, что процессы измельчения и разрастание ОИЛ из образцов опухолевых метастазов аналогичны в случае этих видов рака (Sethuraman 2016, JITC P42). Поскольку начальное выделение опухолевых фрагментов и разрастание лимфоцитов, судя по всему, являются сходными для гистологически разных опухолей, эти технологические прогоны являются достаточными для определения пригодности способа для производства ОИЛ из опухолей ПКГШ, рака шейки матки и меланомы.

[00746] В Таблице 10 приведены источники и характеристики образцов опухолей, использованных для технологических прогонов.

ТАБЛИЦА 10. Образцы опухолей, протестированные для технологических прогонов.

Образец опухоли	**Технологический прогон 1**	**Технологический прогон 2**	**Технологический прогон 3**
Пациент	1001185	600-D455	40231
Источник	Biotheme Research	BioOptions	Moffitt
Ткань	Легкое, левое	Молочная железа, ERPR+Her2-	Меланома
Дата обработки	5 января 2017 г.	12 января 2017 г.	26 января 2017 г.

[00747] Аттестационные испытания трех технологических прогонов для ОИЛ в отделе разработки производственных технологий были выполнены (Таблица 11), как описано ниже. Препарат был протестирован в день 16 и день 22. Секрецию IFN-γ также определяли для трех технологических прогонов (Таблица 12), как подробно описано в другом разделе.

ТАБЛИЦА 11. Результаты тестирования при выпуске препарата для технологических прогонов в отделе разработки производственных технологий.

	Параметр	**Метод анализа**	**Критерии приемлемости**	**Технологические прогоны**		
				Прогон 1	**Прогон 2**	**Прогон 3**
День 16	Стерильность*	BacTAlert	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует	Рост отсутствует
	Микоплазма	ПЦР	Отрицат. со дня 7 разделения	Отрицат.	Отрицат.	Отрицат.
День 22	Жизнеспособность (%)	AOPI	≥ 70%	82,3%	85,13%	84,6%
	Всего жизнеспособных клеток	AOPI	Отчетные показатели	$2,6x10^{10}$	$1x10^{10}$	$1,4x10^{11}$
	Стерильность	Окраска по Граму	Отрицат.	Отрицат.	Отрицат.	Отрицат.
	Стерильность конечного препарата*	BacT/Alert	Рост отсутствует	Отрицат.	Отрицат.	Не завершено
	% $CD45^+CD3^+$	Проточная	≥90%	99,3%	96,3%	99,8%

		цитометрия				
	Эндотоксин	EndoSafe	≤0,7 ЕЭ/мл	<0,5 ЕЭ/мл	<0,5 ЕЭ/мл	<0,5 ЕЭ/мл
	Микоплазма в конечном препарате	ПЦР	Отрицат.	Отрицат.	Отрицат.	Отрицат.
	Внешний вид	Визуальная инспекция	Интактный мешок без видимых сгустков	Интактный мешок без видимых сгустков	Интактный мешок без видимых сгустков	Интактный мешок без видимых сгустков

*Конечные результаты определения стерильности для дня 16 и дня 22 не доступны до момента после выпуска конечного препарата для отправки. Результаты окрашивания по Граму в день 22 использовали в качестве показателя стерильности для выпуска препарата для отправки.

ТАБЛИЦА 12. Дополнительная функциональная характеристика: измерение секреции IFN-γ

Функциональная характеристика	**Метод**	**Ожидаемые результаты**	**Технологический прогон**		
			Прогон 1	**Прогон 2**	**Прогон 3**
Стимуляция IFN-γ анти-CD3, CD28, CD137 (пг/миллион клеток)	ELISA	>2 стандартных отклонений превышение относительно не стимулированных	3085±182	2363±437	Не завершено
IFN-γ без стимуляции (пг/миллион клеток)	ELISA	Не применимо	34±5	27±10	Не завершено

[00748] В завершение, данные технологических прогонов показывают, что лекарственный препарат ОИЛ может быть произведен с целью аутологичного введения пациентам.

ПРИМЕР 4: Лимфодеплеция

[00749] 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%

HypoThermosol™ в Plasma-Lyte A™ (по объему) и до 0,5% ЧСА (совместимой для инфузии человеку) с содержанием 300 МЕ/мл IL2. Конечный препарат 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 $\leq 75\times10^{99}$

ИЛИ

2) 500 мл (в инфузионном мешке емкостью 600 мл), если общее количество собранных ОИЛ составляет $<150\times10^{9}$.

[00750] 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, полученном 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 5: Способ 2A – день 0

[00751] В данном примере описан подробно день 0 протокола для способа 2A, описанного в примерах 1-4.

[00752] Подготовка.

1. Убеждаются, что среда для промывания опухоли, CM1, и IL-2 находятся в пределах срока годности.

2. Помещают CM1 (клеточная среда 1) в инкубатор.

[00753] Метод.

1. Очищают бокс биологической безопасности (ББББ).

2. Устанавливают седиментационные пластины для текущего контроля и оставляют в боксе биологической безопасности на 1-2 часа в течение процедуры.

3. Помещают среду CM1 для ОИЛ в бокс биологической безопасности.

4. Готовят среду CM1 для ОИЛ, содержащую 6000 МЕ/мл IL-2:

4.1. 1 л CM1

4.2. 1 мл IL-2 (6000000 МЕ/мл)

4.3. Помещают 25 мл CM1+IL2 в 50-мл коническую пробирку, которая будет использована для фрагментов при добавлении к G-REX.

4.4. Помещают в инкубатор на 37°C для предварительного нагревания.

5. Протирают упаковку с G-REX 100MCS 70% спиртом и помещают в бокс биологической безопасности. Закрывают все зажимы за исключением линии с фильтром.

6. Проводят калибровку насоса Acacia.

7. Соединяют красную линию флакона G-REX 100MCS с отводящей линией башмака насоса.

8. Соединяют Pumpmatic™ с подводящей линией башмака насоса и помещают в бутылку со средой. Снимают зажимы для прокачки башмака.

9. Прокачивают оставшиеся 975 мл предварительно нагретой CM1, содержащей 6000 МЕ/мл IL-2, в каждый биореактор G-REX 100MCS.

10. Запечатывают сваркой закрытую красную линию, отсоединяют от башмака насоса.

11. Прикрепляют этикетку на G-REX.

12. Помещают G-REX 100MCS в инкубатор до момента использования.

[00754] Измельчение ткани

1. Записывают время начала обработки опухоли.

2. Переносят среду для промывания опухоли в ББВ.

3. Помещают 5 100-мм чашек Петри в бокс биологической безопасности, 3 для промываний, 1 для размещения и 1 для неподходящей ткани. Маркируют чашки соответствующим образом. Неподходящая ткань содержит желтую жировую ткань или некротическую ткань.

4. Помещают три 6-луночных планшета в бокс биологической безопасности.

5. Переносят пипеткой 3-5 мл среды для промывания опухоли в каждую лунку одного из шестилуночных планшетов для избыточных кусков опухоли.

6. Переносят пипеткой 50 мл среды для промывания опухоли в чашки для промывания 1-3 и чашку для размещения.

7. Помещают две 150-мм чашки для измельчения в бокс биологической безопасности.

8. Помещают 3 стерильные 50-мл конические пробирки в ББВ.

9. Помечают одну «среда для промывания пинцета для опухоли», вторую «среда для промывания скальпеля для опухоли» и третью «среда для промывания опухоли, используемая для капель на крышку».

10. Добавляют 5-20 мл среды для промывания опухоли в каждую коническую пробирку. Пинцеты и скальпели окунают в среду для промывания опухоли по мере необходимости в процессе промывания и измельчения опухоли.

11. Помещают скальпель и пинцет в соответствующие пробирки.

12. Используя длинный пинцет, извлекают опухоль(и) из флакона для образцов и переносят в чашку для промывания 1.

13. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 1 в течение ≥3 минут.

14. В процессе инкубации заново маркируют флакон для образцов «Биомасса» и

хранят при 2-8°С до конечного сбора клеток или до момента необходимости в последующем тестировании стерильности.

15. Используя пинцет, переносят опухоль в чашку для промывания 2.

16. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 2 в течение ≥3 минут.

17. В процессе инкубации, используя пипетку для переноса, добавляют примерно 4 расположенные с равными промежутками отдельные капли среды для промывания опухоли в каждый кружок крышек 6-луночных планшетов, маркированных как «чашки для опухолевых фрагментов».

18. Используя пинцет, переносят опухоль в чашку для промывания 3.

19. Инкубируют опухоль при температуре окружающей среды в чашке для промывания 3 в течение ≥3 минут.

20. 150-мм крышку чашки используют для измельчения. Под нее помещают линейку.

21. Используя пинцет, переносят опухоль в чашку для измельчения, измеряют и записывают длину опухоли.

22. Фотографируют опухоль.

23. Проводят начальное измельчение кусков опухоли в чашке для измельчения на промежуточные куски, принимая меры для сохранения опухолевой структуры каждого промежуточного куска.

24. Переносят 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.

25. Работая каждый раз с одним промежуточным куском опухоли, тщательно нарезают опухоль на фрагменты размером до 3х3х3 мм в чашке для измельчения, сверяясь с линейкой, находящейся под чашкой.

26. Продолжают измельчение на фрагменты промежуточных кусков опухоли до тех пор, когда будет измельчена вся ткань промежуточных кусков.

27. Выбирают подходящие фрагменты и при помощи пипетки для переноса переносят до 4 подходящих фрагментов в капли промывающей среды в одном кружке лотка для опухолевых фрагментов. Используя пипетку для переноса, скальпель или пинцет, переносят максимально возможное количество неподходящей ткани и отходов в чашку для неподходящей ткани, чтобы очистить чашку для измельчения. Всю оставшуюся ткань помещают в одну из лунок шестилуночного планшета. (Неподходящая ткань содержит желтую жировую ткань или некротическую ткань).

28. Продолжают обработку, повторяя этапы 23-26 для остальных промежуточных кусков опухоли, обрабатывая по одному промежуточному куску за раз, до завершения обработки всей опухоли. (По мере необходимости получают свежий скальпель или пинцет, на усмотрение занимающегося обработкой лаборанта).

29. Переставляют чашки с фрагментами в заднюю часть ламинарного шкафа.

30. Используя пипетку для переноса, скальпель или пинцет, переносят до 50 лучших опухолевых фрагментов в 50-мл коническую пробирку, маркированную «для опухолевых фрагментов», содержащую CM1.

31. Удаляют всплывающие фрагменты из 50-мл конической пробирки пипеткой для переноса. Записывают число опухолевых фрагментов и всплывших фрагментов.

32. Удаляют все ненужные предметы из ламинарного шкафа, оставляя чашки с подходящей тканью, если они содержат дополнительные фрагменты. Протирают ламинарный шкаф салфеткой со спиртом.

33. Извлекают G-REX 100MCS из инкубатора, протирают 70% спиртом и помещают в бокс биологической безопасности.

34. Вращают коническую пробирку с опухолевыми фрагментами и выливают содержимое 50-мл конической пробирки во флакон G-REX 100MCS.

35. Если один или более опухолевых фрагментов, перенесенных во флакон G-REX 100M, всплывают, отбирают один дополнительный опухолевый фрагмент, при наличии, из лотка для подходящей ткани и переносят его во флакон G-REX 100M.

36. Записывают номер(а) инкубатора и общее количество фрагментов, добавленное в каждый флакон.

37. Помещают биореактор G–REX 100M в инкубатор при 37°C, 5% CO_2.

38. Любую неиспользованную опухоль помещают в 100 мл HypoThermosol и доставляют в лабораторию.

39. Записывают время прекращения обработки опухоли.

40. Отбрасывают любую неиспользованную полную среду для ОИЛ, содержащую IL-2, и любые неиспользованные аликвоты IL-2.

41. Очищают бокс биологической безопасности.

42. Помещают образец биомассы в надлежащие условия хранения.

43. Записывают данные.

44. Сохраняют информацию в виде файла с указанием названия образца, даты обработки опухоли в подготовленный файл пациента.

45. Заказывают и контролируют доставку седиментационных пластин в микробиологическую лабораторию.

ПРИМЕР 6: Способ 2A – день 11

[00755] В данном примере описан подробно день 11 протокола для способа 2A, описанного в примерах 1-4.

[00756] Предварительная подготовка.

1. За день до манипуляций:

1.1. CM2 можно готовить за день до манипуляций. Хранят при 4°C.

2. День проведения манипуляций.

2.1. Готовят комплект принадлежностей для питающих клеток.

2.1.1. Закрывают все зажимы на комплектах коннекторов CC2 и 4S-4M60.

2.1.2. Стерильно соединяют сваркой 4 иглы комплекта 4S-4M60 с линией для игл

на CC2, удаляя иглу.

2.1.3. Откладывают для объединения питающих клеток.

2.2. Готовят 5 мл среды для криоконсервирования в соответствии с CTF-FORM-318 и помещают на 4°C до момента использования.

[00757] Мониторинг чистого помещения – перед проведением манипуляций

1. Записывают информацию о чистом помещении.

2. Бокс биологической безопасности (ББББ) очищают большими салфетками, пропитанными спиртом, или опрыскивают спиртом.

3. Проверяют количество частиц за 10 минут до начала манипуляций.

4. Устанавливают седиментационные пластины для текущего контроля, и оставляют в боксе биологической безопасности на 1-2 часа в течение процедуры.

[00758] Подготовка флакона G-Rex 500MCS:

1. Используя 10-мл шприц, асептически переносят 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.

2. Используют избыток воздуха в шприце для прочистки линии, отбирают немного среды из мешка и выпускают обратно в мешок. Это гарантирует, что весь IL-2 смешан со средой. Тщательно перемешивают.

3. Открывают внешнюю упаковку и помещают G-Rex 500MCS в ББББ. Закрывают все зажимы на устройстве, за исключением крупной линии с фильтром.

4. Стерильно соединяют сваркой красную собирающую линию от G-Rex 500MCS с отводящей линией насоса.

5. Соединяют канюлю Люэра мешка для проведения биопроцессов с конусом Люэра башмака насоса.

6. Подвешивают мешок для проведения биопроцессов на штатив для внутривенных вливаний, открывают зажимы и закачивают 4,5 литра среды CM2 в G-Rex 500MCS. Прочищают линию, зажимают и запечатывают сваркой.

7. Сохраняют линию от насоса к среде. Ее используют при подготовке питающих клеток.

8. Помещают G-Rex 500MCS в инкубатор.

[00759] Подготовка облученных питающих клеток

1. Запечатывают и извлекают иглу(ы) из 1-л TP. Зажимают обе линии.

2. Записывают сухую массу 1-л пакета для переноса (TP).

3. Стерильно соединяют сваркой 1-л пакет для переноса с башмаком насоса Acacia на ~12” от мешка.

4. Другой конец трубки насоса все еще соединен с 10-л контейнером Labtainer™.

5. Закачивают 500 мл CM2 по массе в TP.

6. Закрывают зажим и запечатывают вблизи сварного шва.

7. Помещают в инкубатор.

8. Проверяют и отключают мешки для питающих клеток.

9. Записывают лот используемых питающих клеток.

10. Протирают мешки спиртом.

11. Помещают в пакеты с застежкой-молнией.

12. Размораживают питающие клетки в водяной бане при 37°С (± 1°С). Записывают температуру водяной бани.

13. Извлекают и высушивают марлей.

14. Передают питающие клетки через приемное окно в подготовительную комнату.

15. Переносят в ББВ в чистом помещении.

16. Используя ранее подготовленный комплект принадлежностей для питающих клеток, соединяют сваркой 1-л ТР со средой с одной из неиспользуемых линий на стороне порта для образца 3-стороннего запорного клапана как можно ближе к герметичному соединению, теряя как можно меньше трубки.

17. Помещают комплект принадлежностей для питающих клеток в ББВ.

18. Вводят в каждый из 3 пакетов с питающими клетками иглу из комплекта принадлежностей для питающих клеток в один порт пакета с питающими клетками.

19. Поворачивают запорный клапан так, что 1-л ТР находится в положении «закрыто».

20. Работая с одним мешком за раз, открывают зажимы на линии к пакету с питающими клетками, выпускают воздух из шприца и отбирают содержимое из пакета с питающими клетками в шприц. Выпущенный из шприца воздух способствует извлечению клеток. Закрывают зажим на линии к пакету с питающими клетками.

21. Записывают извлеченный объем размороженных питающих клеток в каждом мешке.

22. Поворачивают запорный клапан так, что пакет с питающими клетками находится в положении «закрыто».

23. Открывают зажим на ТР и выпускают содержимое шприца в ТР.

24. Убеждаются, что линия была прочищена, и повторно зажимают ТР. Может потребоваться отобрать некоторое количество воздуха в шприц из ТР для использования в прочистке линии.

25. Тщательно перемешивают клетки.

26. Закрывают зажим на линии к пакету с питающими клетками.

27. Поворачивают запорный клапан так, что порт шприца находится в положении «закрыто». Отсоединяют 60-мл шприц от запорного клапана.

28. Используют новый шприц для каждого пакета с питающими клетками.

29. Оставляют шприц после последнего мешка.

30. Тщательно перемешивают последний препарат питающих клеток.

31. Поворачивают запорный клапан так, что емкость с суспензией питающих клеток находится в положении «закрыто».

32. Смешивают клетки и, используя 5-мл шприц и безыгольный порт, промывают порт некоторым количеством клеточного раствора для гарантии точности отбора

образцов, отбирают 1 мл клеток и помещают в пробирку для подсчета.

33. Повторяют со вторым шприцем. Для каждого из этих двух независимых образцов проводят подсчет клеток.

34. Поворачивают запорный клапан так, что емкость с суспензией питающих клеток находится в положении «открыто», и, используя 60-мл шприц, соединенный с комплектом принадлежностей, выпускают воздух в ТР для прочистки линии.

35. Извлекают шприц и закрывают порт Люэра новым стерильным колпачком.

36. Запечатывают сваркой ТР вблизи сварного шва, удаляют комплект принадлежностей.

37. Записывают массу пакета для переноса с клеточной суспензией и рассчитывают объем клеточной суспензии.

38. Помещают в инкубатор.

39. Проводят подсчет одиночных клеток в образце питающих клеток, записывают данные и добавляют первичные данные подсчета к документации на партию.

40. Документируют программу подсчета клеток Cellometer.

41. Проверяют, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer.

42. Рассчитывают общую плотность жизнеспособных клеток в пакете для переноса с питающими клетками.

43. Если число клеток составляет $<5x10^9$, размораживают больше клеток, подсчитывают и добавляют к питающим клеткам.

44. Повторно взвешивают пакет с питающими клетками и рассчитывают объем.

45. Рассчитывают объем клеток для удаления.

[00760] Добавление питающих клеток в G-REX

1. Стерильно соединяют сваркой 4” набор для переноса с ТР.

2. В БББ соединяют соответствующего размера шприц с канюлей Люэра, соединенной с пакетом для переноса питающих клеток.

3. Тщательно перемешивают клетки и удаляют объем, рассчитанный на этапе 40 или 41, для достижения количества $5,0x10^9$ клеток. Отбрасывают ненужные клетки.

4. Используя 1-мл шприц и иглу 18G для отбора 0,150 мл OKT3, извлекают иглу и переносят в ТР для питающих клеток через канюлю Люэра.

5. Промывают трубку и шприц суспензией питающих клеток и тщательно перемешивают содержимое мешка. Прочищают линию воздухом из шприца.

6. Извлекают G-Rex 500MCS из инкубатора, протирают салфетками со спиртом и помещают рядом с SCD.

7. Стерильно соединяют сваркой пакет с питающими клетками с красной линией на G-Rex 500MCS. Снимают зажим с линии и позволяют питающим клеткам перетекать во флакон под действием силы тяжести.

8. Убеждаются в том, что линия была полностью очищена, затем запечатывают сваркой линию вблизи исходного шва и удаляют пакет с питающими клетками.

9. Возвращают G-Rex 500MCS в инкубатор и записывают время.

[00761] Подготовка ОИЛ: записывают время начала сбора ОИЛ

1. Осторожно извлекают G-REX 100MCS из инкубатора и закрывают все зажимы за исключением крупной линии с фильтром.

2. Соединяют сваркой 1-л пакет для переноса с красной линией на G-REX 100MCS.

3. Закрывают зажим на 300-мл ТР. Запечатывают сваркой на расстоянии ~12 дюймов от мешка, удаляя иглу. Записывают сухой вес/массу.

4. Стерильно соединяют сваркой 300-мл пакет для переноса с линией сбора клеток на 100MCS вблизи сварного шва. Пережимают линию.

5. Открывают все зажимы, ведущие к 1-л ТР.

6. Используя GatheRex, переносят ~900 мл культурального супернатанта в 1-л пакет для переноса. Gatherex останавливают, когда в линию поступает воздух. Пережимают линию и запечатывают сваркой.

7. Вращают флакон до открепления всех клеток от мембраны. Проверяют мембрану, чтобы убедиться, что все клетки открепены.

8. Отклоняют флакон от собирающей трубки и позволяют опухолевым фрагментам оседать вдоль края.

9. Медленно наклоняют флакон в сторону собирающей трубки так, чтобы фрагменты оставались на противоположной стороне флакона.

10. Используя GatheRex, переносят остаточную клеточную суспензию в 300-мл пакет для переноски, избегая опухолевых фрагментов.

11. Повторно убеждаются, что все клетки удалены с мембраны.

12. При необходимости, производят обратное промывание, открывая зажимы на GatheRex и позволяя некоторому количеству среды протекать во флакон G-REX 100MCS под действием силы тяжести.

13. Энергично постукивают по флакону для отделения клеток и перекачивают их в 300-мл ТР.

14. После завершения сбора закрывают красную линию и запечатывают сваркой.

15. Запечатывают сваркой собирающую линию, оставляя примерно такую же длину трубки, как тогда, когда была записана сухая масса.

16. Записывают массу (включая сухую массу) 300-мл ТР, содержащего клеточную суспензию, и рассчитывают объем клеточной суспензии.

17. В ББВ вводят в 300-мл ТР 4” иглу из набора для переноса плазмы. Тщательно перемешивают клетки. Асептически соединяют 5-мл шприц, отбирают 1 мл, помещают в криопробирку. Повторяют со вторым шприцем. Эти образцы используют для подсчета и определения жизнеспособности клеток.

18. Повторно зажимают и заменяют колпачок Люэра новым стерильным колпачком Люэра.

19. Помещают в инкубатор и записывают время помещения в инкубатор.

20. Производят подсчет одиночных клеток в каждом образце, записывают данные и добавляют первичные данные подсчета к документации на партию.

21. Документируют программу подсчета клеток Cellometer.

22. Проверяют, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer.

23. При необходимости, корректируют общую плотность жизнеспособных ОИЛ до $\leq 2x10^8$ жизнеспособных клеток.

24. Рассчитывают объем для удаления, или оставляют пометку, что корректировка не нужна.

25. В БББ асептически соединяют соответствующего размера шприц с 300-мл TP.

26. При необходимости, удаляют рассчитанный объем клеток, рассчитанный по таблице «Расчет объема для удаления».

27. Зажимают и запечатывают сваркой 300-мл TP.

28. Переносят избыток клеток в соответствующего размера коническую пробирку и помещают в инкубатор с неплотно закрытой крышкой для последующего криоконсервирования.

29. Извлекают G-Rex 500MCS из инкубатора и помещают рядом с SCD.

30. Стерильно соединяют сваркой 300-мл TP с подводящей линией насоса Acacia.

31. Стерильно соединяют сваркой красную линию G-Rex 500MCS с отводящей линией насоса Acacia.

32. Закачивают клетки во флакон.

33. Убеждаются, что линия полностью очищена, затем запечатывают сваркой красную линию вблизи исходного сварного шва.

34. Проверяют, чтобы все зажимы на G-Rex 500MCS были закрыты за исключением крупной линии с фильтром.

35. Возвращают G-Rex 500MCS в инкубатор и записывают время помещения G-Rex в инкубатор.

36. Заказывают и контролируют доставку седиментационных пластин в микробиологическую лабораторию.

Криоконсервирование избытка клеток

[00762] Рассчитывают количество среды для замораживания, которое будет добавлено к клеткам:

ТАБЛИЦА 13: Целевая концентрация клеток составляет $1x10^8$/мл

A. Общее количество удаленных клеток (из этапа 15)	мл
B. Целевая концентрация клеток	$1x10^8$ клеток/мл
Добавляемый объем среды для замораживания (A/B)	мл

37. Осаждают центрифугированием ОИЛ при 400xg в течение 5 мин при 20°C с полным тормозом и полным ускорением.

38. Асептически удаляют аспирацией супернатант.

39. Осторожно постукивают по дну пробирки для ресуспендирования клеток в

оставшейся жидкости.

40. Продолжая осторожно постукивать по пробирке, медленно добавляют подготовленную среду для замораживания.

41. Разливают аликвоты в соответствующего размера криопробирки и записывают время помещения клеток на -80°C.

ПРИМЕР 7: Способ 2A – день 16

[00763] В данном примере описан подробно день 16 протокола для способа 2A, описанного в примерах 1-4.

[00764] Мониторинг чистого помещения – перед проведением манипуляций.

1. Боксы биологической безопасности очищают большими салфетками, пропитанными спиртом, или опрыскивают спиртом.

2. Проверяют количество частиц за 10 минут до начала манипуляций.

3. Устанавливают седиментационные пластины для текущего контроля, и оставляют в боксе биологической безопасности на 1-2 часа в течение процедуры.

[00765] Сбор и подсчет ОИЛ.

1. Нагревают 10-л мешок с CM4 для культур, инициированных менее $50x10^6$ ОИЛ, в инкубаторе при 37°C в течение по меньшей мере 30 минут или до готовности к использованию.

2. В ББЗ асептически соединяют удлинительную инфузионную линию Бакстера с 10-л мешком Labtainer™.

3. Извлекают флакон G-Rex 500MCS из инкубатора и помещают на столешницу рядом с GatheRex. Проверяют, чтобы все зажимы были закрыты, за исключением крупной линии с фильтром. Передвигают зажим на линии быстрого соединения вблизи соединения «T».

4. Стерильно соединяют сваркой 10-л Labtainer™ с красной собирающей линией на G-Rex 500MCS через свариваемую трубку на удлинительной линии Бакстера.

5. Запечатывают сваркой 2-л пакет для переноса на 2” ниже «Y», удаляя иглу, и записывают сухую массу. Стерильно соединяют сваркой 2-л TP с чистой собирающей линией на G-Rex 500MCS.

6. Устанавливают G-Rex 500MCS на ровной поверхности.

7. Открывают все зажимы на линии, ведущей к 10-л Labtainer™, и, используя GatheRex, переносят ~4 л культурального супернатанта в 10-л Labtainer™.

8. Собирают клетки согласно соответствующим инструкциям для сбора клеток GatheRex.

9. Зажимают красную линию и записывают время начала сбора ОИЛ.

10. GatheRex останавливают, когда в линию поступает воздух. Зажимают красную линию.

11. После удаления супернатанта вращают флакон до открепления всех клеток от мембраны. Наклоняют флакон для того, чтобы трубка находилась на краю флакона.

12. Открывают все зажимы на линии, ведущей к 2-л TP, и, используя GatheRex,

переносят остаточную клеточную суспензию в 2-л ТР, продолжая наклонять край, до тех пор, пока не будут собраны все клетки.

13. Проверяют мембрану на прикрепленные клетки.

14. При необходимости, производят обратное промывание, открывая зажимы на красной линии и позволяя некоторому количеству среды протекать во флакон под действием силы тяжести.

15. Закрывают красную линию и трижды запечатывают сваркой.

16. Энергично постукивают флакон для отделения клеток.

17. Добавляют клетки в 2-л ТР.

18. Запечатывают сваркой 2-л пакет для переноса, оставляя примерно такую же длину трубки, как тогда, когда была записана сухая масса.

19. Оставляют G-Rex 500MCS, его используют при разделении клеток.

20. Записывают массу пакета для переноса с клеточной суспензией и рассчитывают объем клеточной суспензии.

21. Определяют объем клеточной суспензии, включая сухую массу.

22. Стерильно соединяют сваркой 4” набор для переноса с мешком, содержащим клеточную суспензию.

23. В ББВ осторожно перемешивают клетки, при помощи 20-мл шприца отбирают 11 мл и разделяют на аликвоты, как показано в Таблице 14:

ТАБЛИЦА 14. Параметры тестирования.

Тест	**Объем образца**	**Емкость**
Определение количества и жизнеспособности клеток	2-2 мл образца	Криопробирки
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
Поток	2–2 мл	Подсчет неиспользованных клеток (криоконсервированных для будущего тестирования партии)
Остаток клеток		Отбрасывают

24. Запечатывают сваркой. Закрывают крепление Люэра, сохраняя зажим.

25. Маркируют и помещают клеточную суспензию в инкубатор, и записывают время помещения в инкубатор.

26. Рассчитывают новый объем.

27. Записывают объем в 2-л пакете для переноса на основании объема клеточной суспензии и объема, отобранного для КК (11 мл).

28. Инокулируют и заказывают тестирование на стерильность.

29. Хранят образец для определения микоплазмы на 4°C в штативе с образцами, ожидающими анализ на микоплазму.

30. Откладывают до высевания ОИЛ.

[00766] Подсчет клеток:

[00767] Проводят подсчет одиночных клеток, записывают данные и добавляют первичные данные подсчета к документации на партию. Документируют разбавление. Документируют программу подсчета клеток Cellometer. Проверяют, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer.

[00768] Способ, продолжение:

31. Рассчитывают общее количество флаконов, необходимых для субкультивирования.

**Повторно используют исходный флакон и округляют в большую сторону количество дополнительных емкостей.

[00769] Добавление IL-2 к СМ

1. Помещают 10-л мешок AIM-V с Glutamax в БББ.

2. Вводят в мешок со средой иглу 4” набора для переливания плазмы.

3. Прикрепляют 18G иглу к 10-мл шприцу и отбирают 5 мл IL-2 в шприц (конечная концентрация составляет 3000 МЕ/мл).

4. Извлекают иглу, асептически соединяют шприц с набором для переливания плазмы и выпускают IL-2 в мешок.

5. Продувают линию воздухом, отбирают некоторое количество среды и выпускают в мешок. Это гарантирует, что весь IL-2 находится в среде.

6. Повторяют для остальных мешков с AIM-V.

[00770] Подготовка флаконов G-REX 500MCS

1. Определяют количество СМ4 для добавления во флаконы. Записывают объем клеток, добавляемых в каждый флакон, и объем СМ4 5000 мл-А.

2. Закрывают все зажимы, за исключением крупной линии с фильтром.

3. Стерильно соединяют сваркой подводящую линию насоса Acacia с 4” набором для переливания плазмы на мешке со средой, содержащем СМ4.

4. Стерильно соединяют сваркой отводящую линию насоса с G-Rex 500MCS через красную собирающую линию.

5. Закачивают определенное количество СМ4 в G-Rex 500MCS, руководствуясь линиями градуировки на флаконе.

6. Запечатывают сваркой красную линию G-Rex 500MCS.

7. Повторяют этапы 4-6 для каждого флакона. Несколько флаконов могут быть заполнены одновременно за счет наполнения под действием силы тяжести или использования нескольких насосов. Коннектор «Y» можно соединять сваркой с

отводящей линией насоса, и два плеча соединяют сваркой с двумя флаконами G-Rex 500MCS, заполняя оба флакона одновременно.

8. Помещают флаконы в условия 37°C, 5% CO_2.

[00771] Засевание флаконов ОИЛ

1. Закрывают все зажимы на G-Rex 500MCS, за исключением крупной линии с фильтром.

2. Стерильно соединяют сваркой мешок для клеточного препарата с подводящей линией насоса Acacia.

3. Стерильно соединяют сваркой другой конец насоса с красной линией на G-Rex 500MCS.

4. Помещают башмак насоса в насос.

5. Помещают мешок для клеточного препарата на аналитические весы и записывают время добавления ОИЛ во флакон G-REX.

6. Обнуляют весы.

7. Снимают зажимы с линий и закачивают необходимый объем клеток в G-Rex 500MCS, по массе считая 1 г=1 мл.

8. Переворачивают мешок для клеток вверх дном и прокачивают воздух для прочистки линии. Запечатывают сваркой красную линию G-Rex 500MCS. Помещают флакон в инкубатор.

9. Стерильно соединяют сваркой отводящую линию насоса со следующим G-Rex 500MCS через красную собирающую линию.

10. Тщательно перемешивают клетки.

11. Повторяют перенос клеток для всех флаконов.

12. Помещают флаконы в условия 37°C, 5% CO_2, и записывают время добавления ОИЛ во флакон G-REX.

13. Заказывают тестирование седиментационных пластин в микробиологической лаборатории.

14. Записывают регистрационные номера.

15. Заказывают тестирование на стерильность (аэробные и анаэробные микроорганизмы).

16. Контролируют доставку чашек и бутылок в микробиологическую лабораторию.

[00772] Криоконсервирование текущих или избыточных клеток:

1. Рассчитывают необходимое количество среды для замораживания:

Целевая концентрация клеток составляет $1x10^8$/мл; записывают общее количество удаленных клеток. Целевая концентрация клеток составляет $1x10^8$ клеток/мл. Рассчитывают общий объем добавляемой среды для замораживания.

2. Готовят среду для криоконсервирования и помещают на 40°C до использования.

3. Осаждают центрифугированием ОИЛ при 400 x g в течение 5 мин при 20°C с полным тормозом и полным ускорением.

4. Асептически удаляют аспирацией супернатант.

5. Осторожно постукивают по дну пробирки для ресуспендирования клеток в оставшейся жидкости.

6. Продолжая осторожно постукивать по пробирке, медленно добавляют подготовленную среду для замораживания.

7. Разливают аликвоты в соответствующего размера маркированные криопробирки.

8. Помещают пробирки в Mr. Frosty, или аналог, и помещают в морозильную камеру на -80°C.

9. В пределах 72 часов переносят в место постоянного хранения, документируют и записывают дату и время помещения в морозильную камеру на -80°C.

ПРИМЕР 8: Способ 2A – день 22

[00773] В данном примере описан подробно день 22 протокола для способа 2A, описанного в примерах 1-4.

[00774] Документируют отрицательные результаты текущего анализа на стерильность.

[00775] Перед проведением сбора клеток получают предварительные результаты анализа на стерильность, проведенного для дня 16 из микробиологической лаборатории. Связываются с руководителем лаборатории или назначенным лицом для получения дальнейших инструкций, если результаты оказались положительными.

[00776] Мониторинг чистого помещения – перед проведением манипуляций

1. Проверяют количество частиц за 10 минут до начала манипуляций.

2. Боксы биологической безопасности очищают большими салфетками, пропитанными спиртом, или опрыскивают спиртом.

3. Устанавливают седиментационные пластины для текущего контроля, и оставляют в боксе биологической безопасности на 1-2 часа в течение процедуры.

[00777] Предварительная подготовка

1. В БББ асептически соединяют удлинительную инфузионную линию Бакстера с 10-л мешком Labtainer™, или эквивалентным мешком. Маркируют мешок для фильтрата LOVO.

2. Помещают три 1-л мешка с PlasmaLyte A в БББ.

3. Объединяют и маркируют мешки с PlasmaLyte A с 1% ЧСА.

3.1. Закрывают все зажимы на наборе коннекторов 4S-4M60 и вводят в каждый из мешков с PlasmaLyte.

3.2. Соединяют сваркой один из входящих концов 4S-4M60 с подводящей линией башмака насоса Acacia.

3.3. Соединяют сваркой отводящую линию башмака насоса с 3-литровым собирающим мешком. Закрывают все зажимы на 3-л мешке, за исключением линии к насосу.

3.4. Закачивают 3 литра Plasmalyte в 3-литровый мешок. При необходимости, удаляют воздух из 3-л мешка, меняя направление движения в насосе на противоположное.

3.5. Закрывают все зажимы, за исключением линии с канюлей Люэра.

3.6. Используя два 100-мл шприца и иглы 16-18G, добавляют 120 мл 25% ЧСА. Шприцы с красными колпачками.

3.7. Соединяют один шприц с канюлей Люэра на 3-литровом мешке и переносят ЧСА в 3-л мешок с PlasmaLyte. Тщательно перемешивают.

3.8. Повторяют со вторым шприцем.

3.9. Тщательно перемешивают.

3.10. Закрывают все зажимы.

3.11. Используя 10-мл шприц, отбирают 5 мл PlasmaLyte с 1% ЧСА из безыгольного порта на 3-литровом мешке.

3.12. Закрывают шприц колпачком и хранят в БББ для разбавления IL-2.

3.13. Закрывают все зажимы.

3.14. Запечатывают сваркой, удаляя линию с канюлей Люэра из башмака насоса.

3.15. Маркируют промывающий буфер LOVO и датируют. Срок годности истекает через 24 часа при температуре окружающей среды.

[00778] Подготовка IL-2

1. Вносят Plasmalyte/1% ЧСА из 5-мл шприца в маркированную 50-мл стерильную коническую пробирку.

2. Добавляют 0,05 мл маточного раствора IL-2 в пробирку, содержащую PlasmaLyte.

3. Маркируют IL-2 $6x10^4$.

4. Накрывают этикетку и хранят при 2-8°C. Записывают объемы.

[00779] Подготовка клеток

1. Закрывают все зажимы на 10-л мешке Labtainer™. Соединяют удлинительную инфузионную линию Бакстера с 10-л мешком через крепление Люэра.

2. Извлекают флаконы G-REX 500M из инкубатора с температурой 37°C.

3. Стерильно соединяют сваркой красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS с удлинительной инфузионной линией на 10-л мешке для проведения биопроцессов.

4. Стерильно соединяют сваркой прозрачную линию для удаления клеток из G-Rex 500MCS с 3-л собирающим мешком, и маркируют «объединенная клеточная суспензия».

5. Снимают зажимы с красной линии и 10-л мешка.

6. Используя насос GatheRex, уменьшают объем содержимого первого флакона.

Примечание: при обнаружении воздушного пузырька насос можно останавливать преждевременно. Если уменьшение объема не завершено, повторно активируют насос GatheRex.

7. Закрывают зажим на мешке с супернатантом и красной линии.

8. Вращают флакон G-REX 500M до полного ресуспендирования ОИЛ, при этом избегая разбрызгивания или вспенивания. Убеждаются, что все клетки отделились от мембраны.

9. Открывают зажимы на прозрачной линии и 3-л мешке с клетками.

10. Наклоняют флакон G-Rex так, что клеточная суспензия собирается на той стороне флакона, где расположена заборная трубка.

11. Запускают GatherRex для сбора клеточной суспензии. Примечание: если заборная трубка не находится на стыке боковой и нижней мембраны, легкого постукивания по флакону, когда он наклонен под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

12. Убеждаются, что все клетки были удалены из флакона.

13. Если клетки остались во флаконе, добавляют 100 мл супернатанта обратно во флакон, вращают и собирают в мешок для клеточной суспензии.

14. Закрывают зажим на линии, ведущей к мешку для сбора клеток. Открывают зажимы на GatheRex.

15. Запечатывают сваркой прозрачную линию G-Rex 500MCS.

16. Запечатывают сваркой красную линию G-Rex 500MCS.

17. Повторяют этапы 3-16 для следующих флаконов.

18. Необходимо заменять 10-л мешок с супернатантом по мере необходимости после каждого 2-го флакона.

19. Можно использовать несколько GatherRex.

20. Документируют количество обработанных G-Rex 500MCS.

21. Запечатывают сваркой мешок для сбора клеток. Записывают количество G-REX, из которых собраны клетки.

22. Маркером делают отметку на расстоянии ~2” от одного из коннекторов канюли Люэра на новом 3-литровом собирающем мешке.

23. Запечатывают сваркой и удаляют канюлю Люэра чуть ниже отметки.

24. Маркируют как исходный мешок LOVO.

25. Записывают сухую массу.

26. Закрывают все зажимы 170-мкм фильтра для крови.

27. Стерильно соединяют сваркой наконечник фильтра с исходным мешком LOVO чуть ниже отметки.

28. Стерильно соединяют сваркой входную линию фильтра с мешком, содержащим клеточную суспензию.

29. Поднимают вверх клеточную суспензию, вешая мешок с клетками на штатив для внутривенных вливаний, для переноса клеток под действием силы тяжести. (Примечание: нельзя допускать, чтобы исходный мешок свисал с фильтровального аппарата).

30. Открывают все необходимые зажимы и позволяют ОИЛ перетекать из мешка для клеточной суспензии через фильтр в исходный мешок LOVO.

31. После переноса всех клеток в исходный мешок LOVO, закрывают все зажимы, запечатывают сваркой чуть выше отметки и отсоединяют для удаления фильтра.

32. Тщательно перемешивают содержимое мешка и, используя два 3-мл шприца, отбирают 2 независимых 2-мл образца из порта для отбора образцов шприцем для

подсчета и определения жизнеспособности клеток.

33. Взвешивают мешок и определяют разницу между начальной и конечной массой.

34. Записывают данные, включая сухую массу, и помещают в инкубатор.

[00780] Подсчет клеток

[00781] Проводят подсчет одиночных клеток в каждом образце, записывают данные и добавляют первичные данные подсчета к документации на партию. Документируют программу подсчета клеток Cellometer. Проверяют, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer. Определяют общее количество ядросодержащих клеток. Определяют количество ОКЯК, которое необходимо удалить для достижения количества, равного 1,5 x 10^{11} клеток для обработки LOVO. Помещают удаленные клетки в соответствующего размера контейнер для утилизации.

[00782] Сбор клеток LOVO

[00783] 10-л Labtainer™ с удлинительной инфузионной линией Бакстера на этапе предварительной подготовки представляет собой мешок для заместительного фильтрата, позже соединенный сваркой с набором LOVO. Включают LOVO и следуют инструкциям на дисплее.

[00784] Проверяют весы и датчик давления

[00785] Для доступа к *Профилю операций прибора*:

1. Нажать кнопку «информация».

2. Нажать вкладку «настройки прибора».

3. Нажать кнопку «профиль операций прибора».

4. Профиль операций прибора появляется на дисплее.

[00786] Проверка весов

1. Убеждаются, что ничто не подвешено на весах, и проверяют показания для каждых весов.

2. Если показания каких-либо весов находятся за пределами диапазона 0 ± 2 г, проводят калибровку весов, как описано в инструкции по калибровке весов от производителя.

3. Если все весы находятся в удовлетворительном состоянии без какого-либо подвешенного груза, подвешивают 1-кг разновес на каждых весах (№№ 1-4) и снимают показания.

4. Если показания каких-либо весов находятся за пределами диапазона 1000 ± 10 г при подвешивании груза массой 1 кг, проводят калибровку весов, как описано в инструкции по эксплуатации LOVO от производителя.

[00787] Проверка датчика давления

1. Проверяют показания датчика давления на экране профиля операций прибора.

2. Н/П: если показание датчика давления находится за пределами 0 ± 10 мм рт.ст., сохраняют новую настройку атмосферного давления в рабочем режиме, как описано в инструкции по эксплуатации LOVO от производителя.

Нажимают контрольную кнопку на экране профиля операций прибора.

Нажимают кнопку проверки на вкладке настроек прибора.

3. Если была произведена калибровка весов или была сохранена новая настройка атмосферного давления, повторяют соответствующие разделы инструкций.

[00788] Для начала процедуры выбирают протокол «Сбор клеток ОИЛ G-Rex» из выпадающего меню на экране выбора протокола и нажимают «старт».

1. На дисплее появляется надпись «настройка процедуры».

2. Нажимают кнопку «информация о растворах».

3. На дисплее появляется надпись «раствор 1». Проверяют вид промывающего буфера, необходимого для раствора 1. (Должно быть написано PlasmaLyte).

4. Нажимают кнопку «далее» для перехода к экрану «раствор 2». Проверяют вид промывающего буфера, необходимого для раствора 2. (Должно быть написано «нет», это указывает на то, что протокол был сконфигурирован для использования только одного вида промывающего буфера, который представляет собой PlasmaLyte).

5. Нажимают кнопку «выполнено» на информационном экране для раствора 2 для возращения к экрану «настройка процедуры».

6. Нажимают кнопку «информация о процедуре».

7. На дисплее появляется надпись «информация о процедуре».

8. Нажимают на поле ввода идентификатора пользователя. На дисплее появляется клавиатура. Вводят инициалы исполнителя и проверяющего. Нажимают кнопку для ввода информации.

9. Нажимают на поле ввода кода источника. На дисплее появляется клавиатура. Вводят № лота препарата. Нажимают кнопку для ввода информации.

10. Нажимают на поле ввода идентификатора процедуры. На дисплее появляется клавиатура. Вводят «Сбор клеток ОИЛ». Нажимают кнопку для ввода информации.

11. Если необходимо ввести дополнительные примечания, нажимают на поле ввода примечания к процедуре. На дисплее появляется клавиатура. Вводят примечания. Нажимают кнопку для ввода информации.

Примечание: поле ввода примечаний к процедуре является необязательным для заполнения и может быть оставлено пустым.

12. Нажимают кнопку «выполнено» на экране «информация о процедуре» для возращения к экрану «настройка процедуры».

13. Убеждаются, что появляется кнопка «выполнено» при нажатии кнопки «информация о процедуре». Если отсутствует кнопка «выполнено», вновь нажимают кнопку «информация о процедуре» и убеждаются, что заполнены все поля для идентификатора пользователя, кода источника и идентификатора процедуры.

14. Нажимают кнопку «конфигурация параметров».

15. На дисплее появляется надпись «общая информация о процедуре»

16. Нажимают на поле ввода объема источника (мл). На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вводят рассчитанный объем клеточной суспензии (мл) из Таблицы

1.

17. Нажимают кнопку для ввода информации.

18. Нажимают на поле ввода PCV источника (%). На дисплее появляется надпись ОИЛ (жизнеспособные+мертвые).

19. Нажимают на поле ввода клеточной концентрации. На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вводят общую клеточную концентрацию/мл из Таблицы 14 для исходного препарата в единицах «х 10^6/мл». Данные могут быть в диапазоне от 00,0 до 99,9. Нажимают кнопку для ввода информации и возвращаются к экрану «общая информация о процедуре». Примечание: после ввода клеточной концентрации поле ввода PCV источника (%) на экране «общая информация о процедуре» показывает значение PCV (%), рассчитанное LOVO на основании данных о клеточной концентрации, введенных оператором.

20. На экране «общая информация о процедуре» нажимают кнопку «далее» для перехода к экрану 4 из 8, экрану «объем конечного препарата (объем ретентанта)». Примечание: на экранах 2 и 3 отсутствуют поля для ввода, заполняемые оператором.

21. На дисплее появляется надпись «объем конечного препарата (объем ретентанта)».

22. Используя значение общего количества ядросодержащих клеток (ОКЯК) из Таблицы 15, определяют целевой объем конечного препарата в таблице, приведенной ниже (Таблица 16). Вводят объем конечного препарата (мл), связанный с диапазоном клеток в процессе настройки процедуры LOVO.

ТАБЛИЦА 15. Определение целевого объема конечного препарата.

Диапазон клеток	**Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)**
0 <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток ≤7,1E10	150
7,1E10 <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток ≤1,1E11	200
1,1E11 <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток ≤1,5E11	250

ТАБЛИЦА 16. Целевой объем препарата.

Общее количество ядросодержащих клеток (ОКЯК) х10^6	**Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)**

23. Для введения конкретного объема из Таблицы 16 нажимают на поле ввода объема конечного препарата (мл). На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вводят нужный объем конечного препарата в единицах (мл). Нажимают кнопку для ввода

информации.

24. Нажимают на экран «объем конечного препарата (объем ретентанта) для возращения к экрану «настройка процедуры». Примечание: на экранах 5-8 отсутствуют поля для ввода, заполняемые оператором.

25. Убеждаются, что появляется надпись «выполнено» при нажатии кнопки «конфигурация параметров». Если надпись «выполнено» не появляется, вновь нажимают кнопку «информация о процедуре» и убеждаются, что внесены данные об объеме источника и PCV источника на странице 1. Также убеждаются, что, либо стоит флажок в поле для целевого минимального объема конечного препарата, либо внесены данные в поле объема конечного препарата (мл) на странице 4.

26. Нажимают кнопку «расчет» в верхнем правом углу экрана.

27. На дисплее появляется надпись «сводный расчет». Подтверждают достаточные и точные данные для источника и промывающего буфера PlasmaLyte.

28. Загружают одноразовый комплект: следуют инструкциям на экране для загрузки комплекта, выбирая кнопку справки «(?)».

29. Делают пометку об объемах, показанных для фильтрата и раствора 1 (написано PlasmaLyte).

30. Делают пометку об объемах, показанных для фильтрата и раствора 1 (написано PlasmaLyte).

31. Для получения инструкций по загрузке одноразового комплекта нажимают кнопку справки или следуют инструкциям в руководстве пользователя для получения подробных инструкций.

32. После загрузки стандартного одноразового комплекта LOVO нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется надпись «информация о контейнере и расположении». Удаляют мешок с фильтратом с весов №3.

33. Для данного протокола контейнер фильтрата является «новым» и «не на весах».

34. Если контейнер фильтрата уже показан как «новый» и «не на весах», не вносят никаких изменений.

35. Если тип контейнера фильтрата показан как «исходный», нажимают кнопку «исходный» для переключения на «новый».

36. Если расположение фильтрата указано как «на весах» нажимают кнопку «на весах» для переключения на «не на весах».

37. Если объем получаемого фильтрата составляет $\leq$2500 мл, расположение контейнера фильтрата указано как «на весах». Для согласованности между прогонами расположение контейнера фильтрата изменяют на «не на весах» и тип контейнера указывают как «новый».

38. Нажимают кнопку «на весах» для переключения на «не на весах». Подсоединяют набор для переноса, используя метод стерильной сварки, для замены контейнера фильтрата одноразового комплекта LOVO на 10-л мешок. Вскрывают сварной шов.

39. Помещают контейнер фильтрата на столешницу. НЕ подвешивают мешок с фильтратом на весах № 3. Весы № 3 остаются пустыми во время процедуры.

40. Открывают все пластиковые зажимы на трубке, ведущей к контейнеру с фильтратом. Примечание: если трубка была удалена из зажима F во время сварки, заменяют зажим.

41. Нажимают на поле ввода емкости контейнера фильтрата. На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вносят общую емкость нового фильтрата (10000 мл). Нажимают кнопку «выполнено» для ввода данных.

42. Используют метод стерильной сварки для замены контейнера фильтрата одноразового комплекта LOVO на 10-л мешок. Вскрывают сварной шов. Примечание: если трубка была удалена из зажима F во время сварки, заменяют зажим.

43. Помещают новый контейнер фильтрата на столешницу. НЕ подвешивают мешок с фильтратом на весах № 3. Весы № 3 остаются пустыми во время процедуры.

44. Открывают все пластиковые зажимы на трубке, ведущей к контейнеру с фильтратом.

45. Для контейнера ретентата на дисплее появляется надпись «исходный» и «на весах».

46. Не вносят никаких изменений для контейнера ретентата.

47. Когда внесены все изменения для контейнера фильтрата и введена соответствующая информация, нажимают кнопку «далее».

48. На дисплее появляется трафарет проверки в сухом состоянии одноразового комплекта. Проверяют, чтобы комплект был загружен правильно, затем нажимают кнопку «да».

49. Все механические зажимы LOVO закрываются автоматически и на дисплее появляется надпись «проверка установки одноразового комплекта». LOVO проводит серию этапов герметизации для проверки комплекта.

50. После успешного проведения проверки одноразового комплекта на дисплее появляется надпись «соединительные растворы».

51. Промывающий объем составляет 3 л. Указывают это значение на экране.

52. Используя метод стерильной сварки, соединяют 3-л мешок PlasmaLyte с трубкой, проходящей через зажим 1. Вскрывают сварной шов.

53. Вешают мешок с PlasmaLyte на штатив для внутривенных вливаний.

54. Открывают все пластиковые зажимы на трубке, ведущей к мешку с PlasmaLyte.

55. Убеждаются, что объем входящего раствора составляет 3000 мл. Это было внесено ранее.

56. Нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется трафарет заправки одноразового комплекта. Убеждаются, что PlasmaLyte присоединен, и все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к PlasmaLyte, открыты, затем нажимают кнопку «да». Примечание: поскольку только один вид промывающего буфера (PlasmaLyte) используют в процедуре LOVO, никакой раствор не подсоединен к трубке, проходящей

через зажим 2. Зажим Робертса на этой трубке остается закрытым в течение процедуры.

57. Начинается заправка одноразового комплекта, и на дисплее появляется надпись «заправка одноразового комплекта». Визуально наблюдают, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком с PlasmaLyte. Если жидкость не движется, нажимают кнопку «пауза» на экране и проверят, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы, нажимают кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки одноразового комплекта.

58. После успешного завершения заправки одноразового комплекта на дисплее появляется надпись «соединение источника».

59. Для этого протокола контейнер источника является «новым» и «не на весах».

60. Если контейнер источника уже показан как «новый» и «не на весах», не вносят никаких изменений.

61. Если расположение источника указано как «на весах» нажимают кнопку «на весах» для переключения на «не на весах».

62. Нажимают на поле ввода емкости (мл) источника. На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вносят емкость контейнера, содержащего исходный препарат. Нажимают контрольную кнопку для ввода данных**.** Примечание: введенные данные о емкости источника используют для проверки того, что мешок источника способен вмещать дополнительный раствор, который добавляют в мешок во время фазы заправки источника.

63. Используя метод стерильной сварки, соединяют контейнер источника с трубкой, проходящей через зажим S. Вскрывают сварной шов. Удаляют трубку из зажима по мере необходимости.

64. Убеждаются в том, что трубка из источника помещена в зажим S.

65. Нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется трафарет «заправка источника». Проверяют, чтобы источник был соединен с одноразовым комплектом и все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к источнику, были открыты, затем нажимают кнопку «да».

66. Начинается заправка источника, и на дисплее появляется надпись «заправка источника». Визуально наблюдают, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком источника. Если жидкость не движется, нажимают кнопку «пауза» на экране и проверят, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы, нажимают кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки источника.

67. После успешного завершения заправки источника, на дисплее появляется надпись «начало процедуры».

68. Нажимают кнопку «старт». Появляется экран «предварительная промывка, цикл 1» с инструкциями «покрыть IP, перемешать источник».

69. Выполняют предварительное покрытие мешка IP.

70. Перед нажатием кнопки «старт» снимают мешок IP с весов № 2 (также можно

удалить трубку из направляющей детали для трубки верхнего порта IP) и вручную переворачивают его, чтобы позволить промывающему буферу, добавленному на этапе заправки одноразового комплекта, покрыть все внутренние поверхности мешка.

71. Вновь вешают мешок IP на весы № 2 (этикетка на мешке направлена влево). Повторно устанавливают трубку верхнего порта в направляющую деталь для трубки, если она была удалена.

72. Перемешивают мешок источника.

73. Прежде, чем нажать кнопку «старт», снимают мешок источника с весов № 1 и переворачивают несколько раз для получения однородной клеточной суспензии.

74. Вновь вешают мешок источника на весы № 1 или на штатив для внутривенных вливаний. Убеждаются, что мешок не раскачивается.

75. Нажимают кнопку «старт».

76. LOVO начинает прокачивать жидкость из мешка источника и на дисплее появляется надпись «промывание, цикл 1».

[00789] Во время процедуры LOVO система автоматически делает паузы, чтобы оператор мог манипулировать разными мешками. Во время разных пауз на дисплее появляются разные надписи. Следуют соответствующим инструкциям в каждом случае.

[00790] Пауза для промывания источника

[00791] После опустошения мешка источника LOVO добавляет промывающий буфер в мешок источника для промывания мешка. После добавления рассчитанного объема промывающего буфера в мешок источника, LOVO автоматически делает паузу и на дисплее появляется надпись для паузы «промывание источника».

[00792] Когда на дисплее появляется надпись для паузы «промывание источника», оператор:

1. Снимает мешок источника с весов № 1.

1. Переворачивает мешок источника несколько раз, чтобы промывающий буфер мог достичь всей внутренней поверхности мешка.

2. Вновь вешает мешок источника на весы № 1. Убеждается, что мешок не раскачивается на весах № 1.

3. Нажимает кнопку «возобновить».

[00793] LOVO прокачивает промывающую жидкость из мешка источника, затем продолжается автоматическая процедура.

[00794] Пауза для перемешивания мешка IP

[00795] Для подготовки клеток к очередному проходу через вращающее устройство, в мешок IP добавляют промывающий буфер. После добавления промывающего буфера в мешок IP LOVO автоматически делает паузу и появляется экран для паузы «перемешивание мешка IP».

[00796] Когда на дисплее появляется надпись для паузы «перемешивание мешка IP», оператор:

1. Снимает мешок IP с весов № 2. Также можно удалить трубку из направляющей

детали для трубки верхнего порта IP.

2. Переворачивает мешок IP несколько раз для тщательного перемешивания клеточной суспензии.

3. Вновь вешает мешок IP на весы № 2. Также повторно устанавливает трубку верхнего порта IP в направляющую деталь для трубки, если она была удалена. Убеждается, что мешок IP не раскачивается на весах № 2.

4. Нажимает кнопку «возобновить». LOVO начинает прокачивать жидкость из мешка IP.

[00797] Пауза для разминания углов IP

[00798] Во время последнего цикла промывания процедуры LOVO клетки выкачивают из мешка IP через вращающее устройство и в мешок ретентата (конечного препарата). Когда мешок IP пустеет, добавляют 10 мл промывающих буферов в нижний порт мешка IP для промывания мешка. После добавления промывающей жидкости LOVO автоматически делает паузу. На дисплее появляется надпись «разминание углов IP».

[00799] Когда на дисплее появляется надпись для паузы «разминание углов IP», оператор:

1. НЕ снимает мешок IP с весов № 2.

2. Разминает углы мешка IP, все еще висящего на весах № 2, для перевода всех оставшихся клеток в суспензию.

3. Убеждается, что мешок IP не раскачивается на весах № 2.

4. Нажимает кнопку «возобновить».

5. LOVO начинает выкачивать промывающую жидкость из мешка IP.

[00800] После завершения процедуры LOVO на дисплее появляется надпись «удаление препаратов». Когда появляется эта надпись, можно производить манипуляции со всеми мешками в комплекте LOVO.

Примечание: нельзя прикасаться к каким-либо мешкам до появления на дисплее надписи «удаление препаратов».

[00801] Помещают кровоостанавливающий зажим на трубку очень близко к порту на мешке ретентата, чтобы уберечь клеточную суспензию от оседания в трубке и запечатывают тройной сваркой ниже кровоостанавливающего зажима.

[00802] Удаляют мешок ретентата, нарушая среднее герметичное уплотнение, и переносят в ББВ.

[00803] Следуют инструкциям на экране «удаление препаратов».

[00804] Нажимают кнопку «далее». Открываются все механические зажимы LOVO и на дисплее появляется надпись «удаление комплекта».

[00805] Следуют инструкциям на экране «удаление комплекта».

[00806] Нажимают кнопку «далее». Закрываются все механические зажимы LOVO и на дисплее появляется надпись «сводные результаты». Записывают данные с экрана «сводные результаты» в Таблицу 17. Закрывают все насосы и фильтровальные устройства.

ТАБЛИЦА 17. 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.

[00807] Нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется надпись «выбор протокола».

[00808] Процедура выключения LOVO

1. Убеждаются, что все зажимы закрыты и фильтровальное устройство находится в вертикальном положении.

2. Нажимают кнопку «СТОП» на передней части LOVO.

3. На дисплее появляется трафарет «принятие решения о нажатии кнопки СТОП».

4. На дисплее появляется трафарет «подтверждение выключения».

5. Нажимают кнопку «Да». На дисплее появляется надпись «выключение».

6. Через несколько секунд на дисплее появляется надпись «выключение питания». Когда на дисплее появляется эта надпись, выключают LOVO, используя переключатель на задней левой части прибора.

[00809] Записывают объем конечного сформулированного препарата в таблицу.

[00810] Рассчитывают необходимое количество IL-2 из таблицы для конечного препарата

A. Рассчитанное количество IL-2, необходимое для конечного препарата. (300 МЕ/мл IL-2 в конечном препарате):

Объем конечного препарата (мл) [Объем сформулированного клеточного препарата из таблицы объема конечного сформулированного препарата]x 300 МЕ/мл=требуем. МЕ IL-2

_____мл x 300 МЕ=_____ требуем. МЕ IL-2

B. Требуем. МЕ IL-2 ÷ рабочее разведение маточного раствора (концентрация $6x10^4$ МЕ/мл), полученное на этапе приготовления IL-2=объем (мл) IL-2 для добавления к конечному препарату.

_____ требуем. МЕ IL-2, выше] ÷ 60000 МЕ/мл=_____ мл рабочего раствора IL-2

[00811] Определяют количество криомешков и объем архивного образца.

[00812] Отмечают в таблице для целевого объема и объема архивного образца, ниже, количество мешков для криоконсервирования и объем архивного образца для препарата.

[00813] Расчет целевого объема/мешок: (Конечный сформулированный объем – объем, скорректированный на извлечение менее 100% = 10 мл)/количество мешков.

[00814] Готовят клетки в соотношении 1:1 (по объему) с CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions) и IL-2.

1. Собирают соединительное устройство

1.1. Стерильно соединяют сваркой криомешки CS750 с соединительным устройством для клеток CC2, заменяя один из дистальных конусов Люэра для каждого мешка.

1.2. Оставляют зажимы в закрытом положении.

1.3. Маркируют мешки 1-4.

2. Готовят клетки с IL-2 и подключают устройство.

2.1. В БББ вводят в мешок для клеточного препарата 4" иглу набора для переливания плазмы с коннектором канюли Люэра. Убеждаются, что зажим закрыт на наборе для переноса.

2.2. Соответствующего размера шприцем отбирают объем IL-2 в рабочем разведении, определенный на основании Таблицы для конечного препарата.

2.3. Выпускают в препарат LOVO.

2.4. Стерильно соединяют сваркой мешок с препаратом LOVO с одноигольной линией CC2, удаляя иглу.

2.5. Помещают клетки и устройство в транспортный мешок и помещают в условия 2-8°C на ≤15 мин.

3. Добавляют CS10

3.1. В БББ соединяют 3-сторонний запорный клапан с конусом Люэра на мешке с холодной CS10.

3.2. Соединяют соответствующего размера шприц с канюлей Люэра запорного клапана.

3.3. Снимают зажимы на мешке и отбирают количество CS10, определенное в таблице «Конечный объем сформулированного препарата».

3.4. Удаляют шприц и закрывают красным колпачком.

3.5. Повторяют, если нужно несколько шприцев.

3.6. Извлекают клетки/устройство CC2 из холодильника на 2-8°C и помещают в БББ.

3.7. Соединяют первый шприц, содержащий CS10, со средним креплением Люэра запорного клапана. Поворачивают запорный клапан так, что линия к мешкам CS750 находится в положении «закрыто».

3.8. Медленно и с осторожным перемешиванием добавляют CS10 (1:1, по объему) к клеткам.

3.9. Повторяют для дополнительных шприцев с CS10.

[00815] Внесение сформулированного клеточного препарата в криомешки

1. Заменяют шприц соответствующего размера шприцем для объема клеток, который будет внесен в каждый криомешок.

2. Перемешивают клеточный препарат.

3. Открывают зажим, ведущий к мешку для клеточного препарата, и отбирают соответствующий объем.

4. Поворачивают запорный клапан так, что мешок с клеточным препаратом находится в положении «закрыто», и вносят содержимое шприца в криомешок № 1. Прочищают линию воздухом из шприца.

[00816] Записывают объем конечного препарата

1. Используя безыгольный порт и соответствующего размера шприц, отбирают определенное ранее количество для архивного образца.

2. Помещают архивный образец в 50-мл коническую пробирку, маркированную «архивный образец».

3. Используя шприц, соединенный с комплектом принадлежностей, удаляют весь воздух из мешка, втягивая клетки до расстояния примерно 1" за пределами мешка в трубку. Зажимают и запечатывают сваркой. Помещают в условия 2-8°С.

4. Поворачивают запорный клапан так, что криомешки находятся в положении «закрыто».

5. Перемешивают клетки в мешке для клеточного препарата и повторяют этапы 3-8 для остальных мешков CS750, используя новый шприц на запорном клапане и новый шприц для отбора архивного образца клеток.

6. Архивный образец должен быть отложен для обработки после того, как препарат будет в CRF.

[00817] Процедура для морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки (CRF) (смотри также пример 9)

1. Включают CRF (морозильная камера с регулируемой скоростью заморозки CryoMed, модель 7454) и связанный портативный компьютер.

2. Входят в систему, используя учетную запись и пароль.

3. Нажимают на иконку, соответствующую морозильной камере с регулируемой скоростью заморозки, находящуюся на рабочем столе компьютера.

4. Нажимают кнопку «выполнить» на главном экране.

5. Нажимают «открыть профиль», нажимают «открыть».

6. Вводят имя файла прогона, затем дату в указанном формате: прогонММДДГГГГ.

7. Вводят информационный блок для даты без тире, следующим образом ммДДГГГ.

8. Закрывают дверцу CRF.

9. Нажимают «начать прогон».

10. Выбирают COM 6 в выпадающем меню.

11. Нажимают «OK». Ждут примерно 30 секунд.

12. Когда появляется надпись «загрузка профиля», нажимают «OK». Нажимают «сохранить». (Смотри пример 9 для получения подробной информации о профиле заморозки с регулируемой скоростью).

13. Для нажатия зеленой кнопки ждут до момента, когда образцы находятся в CRF.

Морозильную камеру поддерживают при 4°C до помещения в нее образцов.

14. Помещают образцы в CRF.

15. Ждут до момента, когда CRF вернется к температуре 4°C. После достижения температуры, нажимают зеленую кнопку «продолжить». Это инициирует переход программы к следующему этапу.

16. Проводят визуальную инспекцию криомешков в отношении следующего (примечание: не инспектируют на переполнение или недостаточное заполнение): целостность контейнера, целостность портов, целостность герметичных уплотнений, наличие сгустков клеток и наличие частиц.

17. Помещают утвержденные висячие этикетки на каждый мешок.

18. Убеждаются, что этикетка конечного препарата включает: номер лота, название препарата, дату производства, объем препарата, другие добавки, температуру хранения и срок годности.

19. Помещают каждый криомешок (с висячей этикеткой) во внешний мешок.

20. Запечатывают сваркой.

21. Помещают в холодовую кассету.

22. Повторяют для каждого мешка.

23. Помещают маркированные криомешки в предварительно подготовленные кассеты и переносят в CRF.

24. Равномерно распределяют кассеты на полках в CRF.

25. Прикрепляют ленточную термопару к центральной кассете, или помещают фиктивный мешок в центральное положение.

26. Закрывают дверцу CRF.

27. После того, как температура камеры достигнет 4°C ± 1,5°C, нажимают кнопку «выполнить» на интерфейсе компьютера.

28. Записывают время и температуру камеры при перенесении препарата в CRF.

[00818] Обработка образца для контроля качества

1. Асептически переносят следующие материалы в ББВ, по мере необходимости, и маркируют в соответствии с таблицей, ниже:

2. Используют новую пипетку для отбора следующих образцов:

КК и архивный образец в Таблице.

3. Доставляют в отдел КК: 1 пробирку для подсчета клеток, 1 пробирку для проверки на эндотоксин, 1 пробирку для проверки на микоплазму, 1 пробирку для окрашивания по Граму, 1 пробирку для рестимуляции и 1 проточную пробирку для немедленного тестирования КК. Оставшиеся дубликаты пробирок помещают в морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки.

4. Связываются с руководителем отдела КК, уведомляя о необходимом тестировании.

5. Смотри Таблицу 18 для инструкций по тестированию и хранению.

ТАБЛИЦА 18. 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
Поток	Криопробирка, хранящаяся при 4°C до завершения тестирования
Архивный образец после формулирования	Криоконсервируют для следующего тестирования: комплект из 5 отдельных пробирок, 1 пробирка для подсчета клеток, 1 пробирка для проверки на эндотоксин, 1 пробирка для проверки на микоплазму, 1 пробирка для окрашивания по Граму и 1 проточная пробирка для немедленного тестирования КК
Рестимуляция	Образец доставляют при комнатной температуре, и анализ следует начинать в пределах 30 минут после результата подсчета клеток

[00819] Подсчет количества клеток

[00820] Проводят подсчет одиночных клеток в каждом образце, записывают данные и добавляют первичные данные подсчета к документации на партию. Документируют программу подсчета клеток Cellometer. Проверяют, чтобы правильное разбавление было использовано для Cellometer.

[00821] Криоконсервирование клеток архивного образа после формулирования:

1. Помещают пробирку в CRF.

2. Переносят в место хранения после завершения замораживания, записывают дату и время помещения в CFR. Записывают дату и время перемещения в LN_2.

[00822] Микробиологическое тестирование

1. Заказывают тестирование седиментационных пластин в микробиологической лаборатории.

2. Записывают регистрационные номера.

3. Заказывают тестирование на стерильность (аэробные и анаэробные микроорганизмы).

4. Контролируют доставку чашек и бутылок в микробиологическую лабораторию.

[00823] **После криоконсервирования мешков с клеточным препаратом**

1. Останавливают морозильную камеру после завершения прогона. Прогон можно останавливать, нажимая на кнопку «стоп» или нажимая клавишу «назад» на клавиатуре морозильной камеры.

2. Извлекают криомешки из кассет.

3. Переносят кассеты в паровую фазу LN_2.

4. Записывают место хранения.

5. Вносят любые дополнительные комментарии, когда вновь открывается окно ввода текста. Это окно открывается независимо от способа остановки прогона.

6. Распечатывают отчет о профиле и добавляют к документации на партию, с отметкой о номере лота для прогона.

7. Прекращают режим нагревания и закрывают окно прогона, нажимая на кнопку «выход».

ПРИМЕР 9: Способ криоконсервирования

[00824] В данном примере описан способ криоконсервирования для ОИЛ, полученных сокращенным закрытым способом, описанным выше в примере 8, с использованием морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки CryoMed, модель 7454 (Thermo Scientific).

[00825] Используемое оборудование, в дополнение к тому, которое описано в примере 9, 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 заморозки CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[00826] Процесс замораживания обеспечивает 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.

[00827] Описание процедуры из данного примера в сочетании со способом из примеров 1-8 приведено на Фигуре 11.

ПРИМЕР 10: Характеризация способа 2A для ОИЛ

В данном примере описана характеризация ОИЛ, полученных сокращенным, закрытым способом, описанным выше. Вкратце, сокращенный, закрытый способ (способ 2A, описанный в примерах 1-9) имеет преимущества перед предшествующими способами производства ОИЛ, приведенными в Таблице 19. Преимущества для пре-ПБР могут

включать: увеличенное количество опухолевых фрагментов на флакон, сокращенное время культивирования, сокращенное количество этапов и/или возможность использования с закрытой системой. Преимущества для перехода от пре-ПБР к ПБР могут включать: сокращение перехода от пре-ПБР к ПБР, сокращенное количество этапов, исключение фенотипического отбора и/или возможность использования с закрытой системой. Преимущества для ПБР могут включать: сокращенное количество этапов, уменьшение продолжительности ПБР, перенос ОИЛ между флаконами в закрытой системе и/или замену среды в закрытой системе. Преимущества для сбора клеток могут включать: сокращенное количество этапов, автоматическое промывание клеток, закрытую систему и уменьшение потери препарата при промывании. Преимущества для конечного препарата и/или продукта могут включать гибкие условия транспортировки.

ТАБЛИЦА 19. Сравнение иллюстративного способа 1С и варианта осуществления способа 2А.

Этап способа	**Способ 1С - Вариант осуществления**	**Способ 2А - Вариант осуществления**
Пре-ПБР	4 фрагмента на 10 флаконов G-REX 10	40 фрагментов на 1 флакон G-REX 100M
	Продолжительность 11-21 дней	Продолжительность 11 дней
Переход от Пре-ПБР к ПБР	Пре-ПБР ОИЛ замораживают до фенотипирования для отбора, затем размораживают для перехода к ПБР (~день 30)	Пре-ПБР ОИЛ непосредственно переводят в ПБР в день 11
	Для ПБР необходимо $>40\times10^6$ ОИЛ	Для ПБР необходимо $25\text{-}200\times10^6$ ОИЛ
ПБР	6 флаконов G-REX 100M в день 0 ПБР	1 флакон G-REX 500M в день 11
	5×10^6 ОИЛ и 5×10^8 питающих клеток МКПК на флакон в день 0 ПБР	$25\text{-}200\times10^6$ ОИЛ и $5x10^9$ питающих клеток МКПК в день 11
	Разделение на 18-36 флаконов в день 7 ПБР	Разделение на $\leq$6 флаконов G-REX 500M в день 16
	Продолжительность 14 дней	Продолжительность 11 дней
Сбор клеток	ОИЛ собирают центрифугированием	ОИЛ собирают при помощи автоматизированной системы промывания клеток LOVO

Конечный препарат	Свежий препарат в Hypothermosol	Криоконсервированный препарат в PlasmaLyte-A+1% ЧСА и CS10, хранящийся в LN_2
	Один инфузионный мешок	Множество аликвот
	Ограниченная стабильность при транспортировке	Более длительная стабильность при транспортировке
Общее расчетное время процесса	43-55 дней	22 дня

[00828] Проводили всего 9 экспериментов, используя ОИЛ, полученные из 9 опухолей, описанных в Таблице 20. Все приведенные данные были получены с размороженными замороженными препаратами ОИЛ, полученными с использованием способа 1C и варианта осуществления способа 2A.

ТАБЛИЦА 20. Описание доноров опухолей, сроков обработки и мест обработки.

Опухоль	Тип ткани	Источник	Ткань
M1061	Меланома	MT group	Первичная - боковая часть левой стопы
M1062	Меланома	Moffitt	Н/П
M1063	Меланома	MT group	Метастатическая С – правая часть паха
M1064	Меланома	MT group	Метастатическая С - левая лодыжка
M1065	Меланома	Bio Options	Метастатическая - подмышечный лимфатический узел
EP11001	ER+PR+	MT group	Первичная - инвазивная протоковая карцинома левой молочной железы
M1056*	Меланома	Moffitt	Н/П
M1058*	Меланома	MT group	Метастатическая - стадия IIB, кожа правой стороны головы
M1023*	Меланома	Atlantic Health	Первичная - правая подмышка

[00829] Процедуры, описанные в настоящем документе для способа 2A, использовали для получения ОИЛ для характеризации в данном примере. Вкратце, для ПБР в день 11 готовили один флакон G-REX 500M, содержащий 5 л CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл rhIL-2, 30 нг/мл анти-CD3 (клон OKT3) и 5×10^9 облученных аллогенных

питающих клеток МКПК. ОИЛ, собранные из пре-ПБР флакона G-REX 100M после уменьшения объема, подсчитывали и высевали во флакон G-REX 500M при плотности в диапазоне от 5×10^6 до 200×10^6 клеток. Затем флакон помещали в инкубатор для культивирования тканей с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2 на пять дней. В день 16 уменьшали объем во флаконе G-REX 500M, ОИЛ подсчитывали и определяли их жизнеспособность. В это время ОИЛ разносили в несколько флаконов G-REX 500M (максимум до шести флаконов), с плотностью засевания в каждом из них 1×10^9 ОИЛ/флакон. Затем все флаконы помещали в инкубаторы для культивирования тканей с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO2 еще на шесть дней. В день 22, день сбора клеток, объем в каждом флаконе уменьшали на 90%, клетки объединяли и фильтровали через 170-мкм фильтр для крови, а затем собирали в 3-л мешок Origin EV3000, или эквивалентный мешок, в процессе подготовки для автоматизированного промывания с использованием LOVO. ОИЛ промывали с использованием автоматизированной системы обработки клеток LOVO, которая заменяет 99,99% среды для культивирования клеток промывающим буфером, состоящим из PlasmaLyte-A с добавлением 1% ЧСА. LOVO действует на основе технологии вращающейся фильтровальной мембраны, которая позволяет извлекать свыше 92% ОИЛ, при этом практически исключая остаточные компоненты среды для культивирования ткани, в том числе сыворотку, факторы роста и цитокины, а также другой детрит и частицы. После завершения промывания проводили подсчет клеток для оценки размножения ОИЛ и их жизнеспособности при сборе клеток. CS10 добавляли к промытым ОИЛ в соотношении 1:1 по объему, получая конечный препарат способа 2A. Конечный сформулированный препарат разделяли на аликвоты в мешки для криогенного хранения, герметично закрывали и помещали в предварительно охлажденные алюминиевые кассеты. Мешки для криогенного хранения, содержащие ОИЛ, затем замораживали, используя морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с методиками, описанными в настоящем документе, в том числе, в примере 9.

[00830] Количество клеток и процент жизнеспособности для девяти экспериментов сравнены на Фигурах 12 и 13.

[00831] Клеточные поверхностные маркеры, определенные в последующих экспериментах, анализировали методом проточной цитометрии (проточный цитометр Canto II, Becton, Dickinson, и Co., Franklin Lakes, NJ, USA), используя соответствующие коммерчески доступные реагенты. Результаты для интересующих маркеров представлены на Фигурах 14-23.

[00832] Использовали различные методы для определения 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). В данном случае применяли два широко используемых метода

измерения длины теломер, а именно, флуоресценцию при in situ гибридизации (FISH) и количественную ПЦР.

[00833] Анализ Flow-FISH проводили, используя набор Dako (K532711-8 RUO Code K5327 Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry, PNA FISH Kit/FITC. Flow, 20 тестов) и следовали инструкциям производителя для измерения средней длины теломерных повторов. Вкратце, клеточную поверхность окрашивали анти-CD3 APC в течение 20 минут при 4°C, а затем GAM Alexa 546 в течение 20 минут. Комплекс антиген-антитело затем сшивали при помощи 2 мМ BS3 (Fisher Scientific) химического перекрестно сшивающего реагента. Связывание Telomere PNA зонда в стандартной популяции Т-клеток с длинными теломерами, Т-клеток лейкозной линии Jurkat 1301 (клетки 1301), использовали в качестве внутреннего стандарта в каждом анализе. Отдельные ОИЛ подсчитывали после инкубации с антителом и смешивали с клетками 1301 (ATCC) при соотношении клеток 1:1. 5×10^5 ОИЛ смешивали с 5×10^5 клеток 1301. In situ гибридизацию проводили в растворе для гибридизации (70% формамид, 1% БСА, 20 мМ Tris, pH 7,0) в двух повторах, а также в присутствии и в отсутствие FITC-конъюгированного Telomere PNA зонда (Panagene), FITC-00-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA, комплементарного последовательности теломерного повтора, в конечной концентрации 60 нМ. После добавления Telomere PNA зонда клетки инкубировали в течение 10 минут при 81°C во встряхиваемой водяной бане. Затем клетки помещали в темное место на ночь при комнатной температуре. На следующее утро избыток теломерного зонда удаляли путем промывания 2 раза PBS, предварительно нагретым до 40°C. После промывания DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) добавляли до конечной концентрации 75 нг/мл. Окрашивание ДНК DAPI использовали для установки дискриминационного окна на клетки в G0/G1 популяции. Анализ образца проводили, используя собственный проточный цитометр авторов изобретения (BD Canto II, Mountain View, CA). Флуоресценцию теломер в тестируемом образце выражали в виде процента от флуоресценции (fl) клеток 1301 в соответствии со следующей формулой: относительная длина теломер = [(средняя FITC fl тестируемых клеток с зондом - средняя FITC fl тестируемых клеток без зонда)×ДНК индекс клеток 1301×100] / [(средняя FITC fl клеток 1301 с зондом – средняя FITC fl клеток 1301 без зонда)×ДНК индекс тестируемых клеток.

[00834] Метод кПЦР в реальном времени также использовали для измерения относительной длины теломер (Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e47., 20, Leukemia, 2013, 27, 897–906). Вкратце, отношение числа копий теломерных повторов к числу копий однокопийного гена (T/S) определяли с использованием термоциклера для ПЦР (Hercules, CA) в 96-луночном формате. Десять нг геномной ДНК использовали в реакции ПЦР либо для теломер, либо для гемоглобина (hgb), и используемые праймеры были следующими: Tel-1b праймер (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), Tel-2b праймер (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), hgb1 праймер (GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC) и hgb2 праймер (CACCAACTTCATCCACGTTCACC). Все образцы анализировали в реакциях как для

теломер, так и для и гемоглобина, и анализ выполняли в трех повторах на одном и том же планшете. В дополнение к тестируемым образцам каждый 96-луночный планшет содержал материал для построения стандартной кривой по пяти точкам от 0,08 нг до 250 нг, представляющий собой геномную ДНК, выделенную из клеток линии 1301. Отношение T/S (-dCt) для каждого образца рассчитывали путем вычитания среднего значения порогового цикла (Ct) гемоглобина из среднего значения Ct теломер. Относительное отношение T/S (-ddCt) определяли путем вычитания отношения T/S для точки 10,0 нг стандартной кривой из отношения T/S каждого неизвестного образца.

[00835] Результаты анализа Flow-FISH представлены на Фигурах 24 и 25, и существенная разница отсутствовала между результатами, полученными способом 1C и способом 2A, это указывает на то, что, как ни странно, свойства ОИЛ, полученных способом 2A, не могут быть предсказаны лишь на основании возраста ОИЛ.

[00836] В завершение, способ 2A позволяет получать эффективный препарат ОИЛ с «молодым» фенотипом, что определяют на основании высоких уровней костимулирующих молекул, низких уровней маркеров истощения и повышенной способности секретировать цитокины при реактивации. Платформа для сокращенного, 22-дневного размножения позволяет быстро получать клинических масштабов дозы ОИЛ для пациентов, срочно нуждающихся в лечении. Криоконсервированный лекарственный препарат обладает очень важными логистическими преимуществами, с возможностью быстрого производства и гибкими условиями транспортной доставки. Этот способ размножения позволяет преодолевать традиционные барьеры на пути к более широкому применению ОИЛ-терапии.

ПРИМЕР 11: Использование коктейля цитокинов IL-2, IL-15 и IL-21

[00837] 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.

[00838] 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 Vβ. IL-15 и IL-21 описаны в другом разделе настоящего документа и в публикации Gruijl, 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/).

[00839] 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 Vβ 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 12: Многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 с участием пациентов, страдающих от меланомы

[00840] Это многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 разработано для оценки безопасности и эффективности терапии при помощи ОИЛ, полученных способом 1C (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 1C и вариант осуществления способа 2A (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 1C), криоконсервированного препарата ОИЛ (полученного с использованием варианта осуществления способа 2A), 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 13: Оценка на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови

[00841] 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.

[00842] Каждый лот облученных питающих клеток МК получают от отдельного

донора. Проводят скрининг каждого лота, или донора, на способность обеспечивать размножение ОИЛ в ПБР в присутствии очищенного анти-CD3 (клон OKT3) антитела и интерлейкина-2 (IL-2). Кроме того, каждый лот питающих клеток тестируют без добавления ОИЛ для подтверждения того, что полученная доза гамма-излучения была достаточной для утраты ими способности к репликации.

Определения/Сокращения

БББ – бокс биологической безопасности

CD3 – кластер дифференцировки 3; поверхностный белок-маркер Т-лимфоцитов

CF – центробежное ускорение

CM2 – полная среда для ОИЛ № 2

КПО – контрактная производственная организация

CO_2 – диоксид углерода

EtOH – этиловый спирт

GMP – Надлежащая производственная практика

IL-2 – интерлейкин 2

МЕ – международные единицы

LN_2 – жидкий азот

мини-ПБР – мини-протокол быстрого размножения

мл – миллилитр

МК – мононуклеарные клетки

Н/П – не применимо

OKT3 – MACS GMP чистое анти-CD3 (клон OKT3) антитело

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

Пре-ПБР – этап, предваряющий протокол быстрого размножения

QS – Quantum Satis; заполнить до этого количества

ПБР – протокол быстрого размножения

ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

Т25–25-$см^2$ флакон для культивирования тканей

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

Процедура

Вводная информация

7.1.1 Гамма-облученные, остановленные в росте питающие МК необходимы для ПБР ОИЛ. Мембранные рецепторы на питающих МК связывают анти-CD3 (клон OKT3) антитело и перекрестно связываются с ОИЛ во флаконе ПБР, стимулируя ОИЛ к размножению. Лоты питающих клеток получают путем лейкафереза цельной крови от отдельных доноров. Лейкаферезный препарат центрифугируют в градиенте плотности фиколл-пак, промывают, облучают и криоконсервируют в условиях GMP.

7.1.2 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

[00843] Лоты питающих клеток оценивают на основании двух критериев: 1) их способности обеспечивать при совместном культивировании увеличение количества ОИЛ в >100 раз и 2) их неспособности к репликации.

7.2.2 Лоты питающих клеток тестируют в формате мини-ПБР, используя две первичные линии пре-ПБР ОИЛ, выращенные в вертикальных флаконах T25 для культивирования тканей.

7.2.3 Лоты питающих клеток тестируют с двумя разными линиями ОИЛ, поскольку каждая линия ОИЛ является уникальной в своей способности пролиферировать в ответ на активацию в ПБР.

7.2.4 В качестве контроля, параллельно с тестируемыми лотами тестируют лот облученных питающих МК, которые, как уже было показано, соответствуют критерию 7.2.1.

7.2.5 Для гарантии того, что все лоты, протестированные в одном эксперименте, прошли эквивалентное тестирование, получают достаточно стоков одних и тех же линий пре-ПБР ОИЛ для тестирования всех условий и всех лотов питающих клеток.

7.2.6 Для каждого тестируемого лота питающих клеток используют всего шесть флаконов T25:

7.2.6.1 Пре-ПБР ОИЛ линия № 1 (2 флакона)

7.2.6.2 Пре-ПБР ОИЛ линия № 2 (2 флакона)

7.2.6.3 Контроль для питающих клеток (2 флакона)

Примечание: для флаконов, содержащих ОИЛ линий № 1 и № 2, оценивают способность лота питающих клеток обеспечивать размножение ОИЛ. Во флаконах с контролем для питающих клеток оценивают неспособность к репликации лота питающих клеток.

[00844] Протокол эксперимента

7.3.1 День -2/3, размораживание линий ОИЛ

7.3.1.1 Готовят среду CM2.

7.3.1.2 Нагревают CM2 в водяной бане с температурой 37°C.

7.3.1.3 Готовят 40 мл CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2. Поддерживают теплой до использования.

7.3.1.4 Помещают 20 мл предварительно нагретой CM2 без IL-2 в каждую из двух 50-мл конических пробирок, маркированных названиями используемых линий ОИЛ.

7.3.1.5 Извлекают две намеченные линии пре-ПБР ОИЛ из хранилища в LN_2 и переносят флаконы в помещение для культивирования тканей.

7.3.1.6 Записывают названия линий ОИЛ.

7.3.1.7 Размораживают 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.

7.3.1.8 Опрыскивают или протирают размороженные флаконы 70% этанолом и переносят флаконы в БББ.

7.3.1.9 Используя стерильную пипетку для переноса, немедленно переносят содержимое флакона в 20 мл CM2 в подготовленной маркированной 50-мл конической пробирке.

7.3.1.10 QS до 40 мл, используя CM2 без IL-2 для промывания клеток.

7.3.1.11 Центрифугируют при 400 x CF в течение 5 минут.

7.3.1.12 Удаляют аспирацией супернатант и ресуспендируют в 5 мл теплой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2.

7.3.1.13 Отбирают небольшую аликвоту (20 мкл) в двух повторах для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Записывают количество клеток.

7.3.1.14 На время подсчета помещают 50-мл коническую пробирку с клетками ОИЛ в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2, с неплотно закрытой крышкой для газообмена.

7.3.1.15 Определяют концентрацию клеток и разбавляют ОИЛ до $1x10^6$ клеток/мл в CM2, содержащей IL-2 в концентрации 3000 МЕ/мл.

7.3.1.16 Культивируют 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.

7.3.1.17 Культивируют разные линии ОИЛ в отдельных 24-луночных планшетах для культивирования тканей во избежание путаницы и потенциального перекрестного загрязнения.

7.3.2 День 0, начало мини-ПБР

7.3.2.1 Готовят достаточно среды CM2 для тестируемого количества лотов питающих клеток. (Например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовят 800 мл среды CM2).

7.3.2.2 Разделяют на аликвоты часть CM2, приготовленной в 7.3.2.1, и добавляют в нее 3000 МЕ/мл IL-2 для культивирования клеток. (Например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовят 500 мл среды CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2).

7.3.2.3 Оставшаяся среда CM2 без IL-2 будет использована для промывания клеток, как описано ниже.

7.3.2.4 Работая с каждой линией ОИЛ отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения, извлекают 24-луночный планшет с культурой ОИЛ из инкубатора и переносят в БББ.

7.3.2.5 Используя стерильную пипетку для переноса или 100-1000 мкл пипеточный дозатор и наконечник, отбирают примерно 1 мл среды из каждой лунки с ОИЛ, которые будут использованы, и помещают в неиспользованную лунку 24-луночного планшета для

культивирования тканей. Это будет использовано для промывания лунок.

7.3.2.6 Используя свежую стерильную пипетку для переноса или 100-1000 мкл пипеточный дозатор и наконечник, перемешивают остальную среду с ОИЛ в лунках для ресуспендирования клеток, а затем переносят клеточную суспензию в 50-мл коническую пробирку, маркированную названием ОИЛ, и записывают объем.

7.3.2.7 Промывают лунки запасной средой и переносят этот объем в ту же самую 50-мл коническую пробирку.

7.3.2.8 Осаждают клетки центрифугированием при 400xCF для получения осадка клеток.

7.3.2.9 Удаляют аспирацией супернатант среды и ресуспендируют 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 $>1{,}3x10^6$ клеток/мл.

7.3.2.10 Используя серологическую пипетку, тщательно перемешивают клеточную суспензию и записывают объем.

7.3.2.11 Отбирают 200 мкл для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток.

7.3.2.12 На время подсчета помещают 50-мл коническую пробирку с клетками ОИЛ в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2, с неплотно закрытой крышкой для газообмена.

7.3.2.13 Записывают количество клеток.

7.3.2.14 Извлекают 50-мл коническую пробирку, содержащую клетки ОИЛ, из инкубатора и ресуспендируют клетки до концентрации $1{,}3x10^6$ клеток/мл в теплой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2. Возвращают 50-мл коническую пробирку в инкубатор с неплотно закрытой крышкой.

7.3.2.15 При желании, сохраняют исходный 24-луночный планшет для повторного культивирования любых остаточных ОИЛ.

7.3.2.16 Повторяют этапы 7.3.2.4–7.3.2.15 для второй линии ОИЛ.

7.3.2.17 Непосредственно перед помещением ОИЛ во флаконы T25 для эксперимента ОИЛ разбавляют 1:10 до конечной концентрации $1{,}3x10^5$ клеток/мл в соответствии с описанием этапа 7.3.2.35, ниже.

[00845] Готовят рабочий раствор MACS GMP чистого анти-CD3 (OKT3) антитела

7.3.2.18 Извлекают маточный раствор OKT3 (1 мг/мл) из холодильника на 4°C и помещают в ББВ.

7.3.2.19 Используют конечную концентрацию 30 нг/мл OKT3 в среде для мини-ПБР.

7.3.2.20 Необходимо 600 нг OKT3 для 20 мл в каждом флаконе T25 для эксперимента; это эквивалентно 60 мкл 10 мкг/мл раствора для каждых 20 мл, или 360 мкл для всех 6 флаконов, тестируемых для каждого лота питающих клеток.

7.3.2.21 Для каждого тестируемого лота питающих клеток готовят 400 мкл

разведенного 1:100 1 мг/мл раствора OKT3 для получения рабочей концентрации 10 мкг/мл (например, для одновременного тестирования 4 лотов питающих клеток готовят 1600 мкл разведенного 1:100 1 мг/мл раствора OKT3: 16 мкл 1 мг/мл раствора OKT3+1,584 мл среды CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2).

[00846] Готовят флаконы T25

7.3.2.22 На этикетке каждого флакона записывают название тестируемой линии ОИЛ, номер дубля флакона, номер лота питающих клеток, дату и инициалы специалиста, выполняющего анализ.

7.3.2.23 Заполняют флакон средой CM2 перед приготовлением питающих клеток.

7.3.2.24 Помещают флакон в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2 для поддержания среды теплой в ожидании добавления остальных компонентов.

7.3.2.25 После приготовления питающих клеток компоненты будут добавлены в среду CM2 в каждый флакон.

[00847] Готовят рабочий раствор MACS GMP чистого анти-CD3 (OKT3) антитела.

ТАБЛИЦА 21: Растворы

Компонент	**Объем во флаконах для совместного культивирования**	**Объем в контрольных (только питающие клетки] флаконах**
CM2+3000 МЕ/мл IL-2	18 мл	19 мл
МК: $1,3x10^7$/мл в CM2+3000 МЕ IL-2 (конечная концентрация $1,3x10^7$/флакон)	1 мл	1 мл
OKT3:10 мкг/мл в CM2+3000 МЕ IL-2	60 мкл	60 мкл
ОИЛ $1,3x10^5$/мл в CM2 с 3000 МЕ IL-2 [конечная концентрация $1,3x10^5$/флакон)	1 мл	0

[00848] Готовят питающие клетки

7.3.2.26 Необходимо минимум $78x10^6$ питающих клеток на каждый лот, тестируемый по данному протоколу. Каждый 1-мл флакон, замороженный в SDBB, содержит $100x10^6$ 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 $100x10^6$ жизнеспособных клеток для каждого ПБР. Альтернативно, если клетки поставляются в 1,8-мл флаконах, только один флакон обеспечит достаточное количество питающих клеток.

7.3.2.27 Перед размораживанием питающих клеток предварительно нагревают примерно 50 мл CM2 без IL-2 для каждого тестируемого лота питающих клеток.

7.3.2.28 Извлекают флаконы выбранного лота питающих клеток из хранилища с LN2, помещают в пакет для хранения с застежкой-молнией и помещают на лед. Переносят

флаконы в помещение для культивирования тканей.

7.3.2.29 Размораживают флаконы внутри закрытого пакета для хранения с застежкой-молнией, помещая его в водяную баня с температурой 37°C.

7.3.2.30 Извлекают флаконы из пакета с застежкой-молнией, опрыскивают или протирают 70% EtOH и переносят флаконы в БББ.

7.3.2.31 Используя пипетку для переноса, немедленно переносят содержимое флаконов с питающими клетками в 30 мл нагретой CM2 в 50-мл конической пробирке. Промывают флакон небольшим объемом CM2 для удаления остаточных клеток во флаконе.

7.3.2.32 Центрифугируют при 400xCF в течение 5 минут.

7.3.2.33 Удаляют аспирацией супернатант и ресуспендируют в 4 мл нагретой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2.

7.3.2.34 Отбирают 200 мкл для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток. Записывают количества клеток.

7.3.2.34 Ресуспендируют клетки в концентрации $1,3x10^7$ клеток/мл в теплой CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2.

7.3.2.35 Разбавляют клетки ОИЛ от концентрации $1,3x10^6$ клеток/мл до $1,3x10^5$ клеток/мл. Работают с каждой линией ОИЛ отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения.

[00849] Начало совместного культивирования

7.3.2.36 Разбавляют клетки ОИЛ от концентрации $1,3x10^6$ клеток/мл до $1,3x10^5$ клеток/мл. Работают с каждой линией ОИЛ отдельно для предотвращения перекрестного загрязнения.

7.3.2.36.1 Добавляют 4,5 мл среды CM2 в 15-мл коническую пробирку.

7.3.2.36.2 Извлекают клетки ОИЛ из инкубатора и тщательно ресуспендируют, используя 10-мл серологическую пипетку.

7.3.2.36.3 Отбирают 0,5 мл клеток из суспензии ОИЛ с концентрацией $1,3x10^6$ клеток/мл и добавляют к 4,5 мл среды в 15-мл коническую пробирку. Возвращают флакон со стоком ОИЛ в инкубатор.

7.3.2.36.4 Тщательно перемешивают.

7.3.2.36.5 Повторяют этапы 7.3.2.36.1–7.3.2.36.4 для второй линии ОИЛ.

7.3.2.36.6 Если одновременно тестируют более одного лота питающих клеток, разбавляют ОИЛ до более низкой концентрации для каждого лота питающих клеток непосредственно перед добавлением ОИЛ.

7.3.2.37 Переносят флаконы с предварительно нагретой средой для одного лота питающих клеток из инкубатора в БББ.

7.3.2.38 Перемешивают питающие клетки путем пипетирования их вверх-вниз несколько раз, используя 1-мл пипетку с наконечником, и переносят 1 мл ($1,3x10^7$ клеток) в каждый флакон для данного лота питающих клеток.

7.3.2.39 Добавляют 60 мкл рабочего маточного раствора OKT3 (10 мкг/мл) в

каждый флакон.

7.3.2.40 Возвращают два контрольных флакона в инкубатор.

7.3.2.41 Переносят 1 мл ($1,3x10^5$) каждого лота ОИЛ во флакон T25 с соответствующей маркировкой.

7.3.2.42 Возвращают флаконы в инкубатор и инкубируют в вертикальном положении. Оставляют до дня 5.

7.3.2.43 Повторяют 7.3.2.36–7.3.2.42 для всех тестируемых лотов питающих клеток.

[00850] День 5, смена среды

7.3.3.1 Готовят CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2. Для каждого флакона необходимо 10 мл.

7.3.3.2 Для предотвращения перекрестного загрязнения одновременно работают с флаконами для одного лота питающих клеток. Извлекают флаконы из инкубатора и переносят в ББВ, стараются не тревожить клеточный слой на дне флакона.

7.3.3.3 Повторяют для всех флаконов, включая контрольный флакон.

7.3.3.4 Используя 10-мл пипетку, переносят 10 мл теплой CM2 с 3000 МЕ/мл IL-2 в каждый флакон.

7.3.3.5 Возвращают флаконы в инкубатор и инкубируют в вертикальном положении до дня 7. Повторяют 7.3.3.1-7.3.3.6 для всех тестируемых лотов питающих клеток.

[00851] День 7, Сбор клеток

7.3.4.1 Для предотвращения перекрестного загрязнения одновременно работают с флаконами для одного лота питающих клеток.

7.3.4.2 Извлекают флаконы из инкубатора и переносят в ББВ, стараются не тревожить клеточный слой на дне флакона.

7.3.4.3 Не тревожа клетки, растущие на дне флаконов, отбирают 10 мл среды из каждого тестируемого флакона и 15 мл среды из каждого контрольного флакона.

7.3.4.4 Используя 10-мл серологическую пипетку, ресуспендируют клетки в оставшейся среде и тщательно перемешивают для разрушения любых сгустков клеток.

7.3.4.5 Записывают объем для каждого флакона.

7.3.4.6 после тщательного перемешивания клеточной суспензии пипетированием, отбирают 200 мкл для подсчета клеток.

7.3.4.7 Подсчитывают количество ОИЛ, используя соответствующую стандартную операционную процедуру с оборудованием для автоматического подсчета клеток.

7.3.4.8 Записывают количества клеток в день 7.

7.3.4.9 Повторяют 7.3.4.1–7.3.4.8 для всех тестируемых лотов питающих клеток.

7.3.4.10 Питающие клетки в контрольных флаконах оценивают на неспособность к репликации, и флаконы, содержащие ОИЛ, оценивают на кратность увеличения количества со дня 0 в соответствии с критериями, перечисленными в Таблице 21 (ниже).

[00852] День 7, Продолжение культивирования питающих клеток в контрольных флаконах до дня 14

7.3.5.1 После завершения подсчета питающих клеток в контрольных флаконах в

день 7 добавляют 15 мл свежей среды CM2, содержащей 3000 МЕ/мл IL-2, в каждый из контрольных флаконов.

7.3.5.2 Возвращают контрольные флаконы в инкубатор и инкубируют в вертикальном положении до дня 14.

[00853] День 14, Продолжение оценки отсутствия пролиферации питающих клеток в контрольных флаконах

7.3.6.1 Для предотвращения перекрестного загрязнения, одновременно работают с флаконами для одного лота питающих клеток.

7.3.6.2 Извлекают флаконы из инкубатора и переносят в ББВ, стараются не тревожить клеточный слой на дне флакона.

7.3.6.3 Не тревожа клетки, растущие на дне флаконов, отбирают примерно 17 мл среды из каждого контрольного флакона.

7.3.6.4 Используя 5-мл серологическую пипетку, ресуспендируют клетки в оставшейся среде и тщательно перемешивают для разрушения любых сгустков клеток.

7.3.6.5 Записывают объем для каждого флакона.

7.3.6.6 После тщательного перемешивания клеточной суспензии пипетированием отбирают 200 мкл для подсчета клеток.

7.3.6.7 Подсчитывают количество клеток, используя соответствующую стандартную операционную процедуру с оборудованием для автоматического подсчета клеток.

7.3.6.8 Записывают количества клеток.

7.3.6.9 Повторяют 7.3.4.1–7.3.4.8 для всех тестируемых лотов питающих клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

[00854] Результаты

10.1.1 Доза гамма-излучения достаточна для лишения питающих клеток способности к репликации. Ожидается, 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.

10.1.2 Ожидается, что все лоты соответствуют критериям оценки для 100-кратного увеличения количества ОИЛ к дню 7 культивирования ПБР.

10.1.3 Ожидается, что в день 14 питающие клетки в контрольных флаконах продолжат демонстрировать отсутствие пролиферации, наблюдаемое в день 7.

[00855] Критерии приемлемости

10.2.1 Соответствие следующим критериям приемлемости отмечают у каждой реплицируемой линии ОИЛ, протестированной для каждого лота питающих клеток.

10.2.2 Приемлемым считают двукратное увеличение количества, как описано далее (представлено ниже в Таблице).

ТАБЛИЦА 22: Критерии приемлемости

Тест	Критерии приемлемости
Облучение МК/Неспособность к	Рост отсутствует в дни 7 и 14

репликации	
Размножение ОИЛ	По меньшей мере 100-кратное увеличение количества каждой линии ОИЛ (минимум $1,3x10^7$ жизнеспособных клеток)

10.2.2.1 Оценивают, является ли доза радиации достаточной для лишения питающих клеток МК способности к репликации при культивировании в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл IL-2.

10.2.2.1.1 Неспособность к репликации оценивают путем подсчета общего количества жизнеспособных клеток (ОКЖК) с использованием автоматического счетчика клеток в день 7 и день 14 ПБР.

10.2.2.1.2 Критерием приемлемости является «отсутствие роста», это означает, что количество жизнеспособных клеток не увеличивается в день 7 и день 14 в сравнении с исходным количеством жизнеспособных клеток в день 0 ПБР.

10.2.2.2 Оценивают способность питающих клеток обеспечивать размножение ОИЛ.

10.2.2.2.1 Рост ОИЛ измеряют на основании кратности увеличения количества жизнеспособных клеток с момента начала культивирования в день 0 ПБР до дня 7 ПБР.

10.2.2.2.2 В день 7 для культур ОИЛ наблюдают 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.

10.2.2.3 В случае несоответствия лота двум приведенным выше критериям, лот тестируют повторно в соответствии с планом действий в чрезвычайных ситуациях, изложенным в разделе 10.3, ниже.

10.2.2.4 После повторного тестирования лота, не соответствующего критериям, любой лот питающих клеток МК, не соответствующий двум критериям приемлемости как при первоначальной оценке, так и повторном тестировании, исключают.

10.2.2.5 Любые лоты питающих клеток МК, которые соответствуют критериям приемлемости, но имеют недостаточно высокие показатели с точки зрения способности обеспечивать размножение ОИЛ в сравнении с другими лотами питающих клеток, протестированными параллельно с теми же линиями пре-ПБР ОИЛ, исключают.

[00856] Экстренное тестирование лотов питающих клеток МК, не соответствующих критериям приемлемости

10.3.1 В случае, если лот питающих клеток МК не соответствует какому-либо из критериев приемлемости, приведенных выше в разделе 10.2, проводят следующие этапы для повторного тестирования лота с целью исключения вероятности того, что причиной является простая ошибка эксперимента.

10.3.2 Если имеются два или более отдельных тестируемых флаконов из лота, тогда лот тестируют повторно. Если остается один, или не остается ни одного, из тестируемых

флаконов из лота, тогда считают, что лот не соответствует критериям приемлемости, приведенным выше в разделе 10.2.

10.3.3 Два квалифицированных сотрудника, включая первого сотрудника, оценивающего сомнительный лот, тестируют лот одновременно.

10.3.4 Повторяют действия, описанные в разделах 7.2–7.3, для повторной оценки сомнительного лота.

10.3.5 Каждый сотрудник тестирует сомнительный лот, а также контрольный лот (как описано выше в разделе 7.2.4).

10.3.6 Для признания лота удовлетворительным, сомнительный лот и контрольный лот должны соответствовать критериям приемлемости, описанным в разделе 10.2, на основании результатов, полученных обоими сотрудниками, выполняющими экстренное тестирование.

10.3.7 В случае соответствия критериям, лот затем передают для дальнейшего использования в КПО, как описано выше в разделе 10.2.

ПРИМЕР 14: Оценка на соответствие отдельных лотов гамма-облученных мононуклеарных клеток периферической крови

[00857] 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 получают 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) обеспечивают >100-кратное увеличение количества ОИЛ в день 7 ПБР. Этот модифицированный протокол оценки на соответствие запланирован для применения к лотам облученных донорских МКПК из SDBB, которые впоследствии тестируют для подтверждения того, что полученная доза гамма-излучения является достаточной для лишения клеток способности к репликации. После установления того, что неспособность к репликации сохраняется у клеток на протяжении 14 дней, лоты донорских МКПК считают «соответствующими требованиям» для использования в получении клинических лотов ОИЛ.

[00858] Ключевые термины и определения

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

AIM-V – коммерчески доступная среда для культивирования клеток

БББ – бокс биологической безопасности

CD – кластер дифференцировки

CM2 – полная среда для ОИЛ № 2

CM2IL2 – CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2

КПО – контрактная производственная организация

CO_2 – диоксид углерода

EtOH – этиловый спирт

GMP – Надлежащая производственная практика

Гр – грей

IL – интерлейкин

МЕ – международные единицы

LN_2 – жидкий азот

мл – миллилитр

Н/П – не применимо

OKT3 – анти-CD3 моноклональное антитело

P20–2-20 мкл пипеточный дозатор

P200–20-200 мкл пипеточный дозатор

МКПК – мононуклеарные клетки периферической крови

P1000–100-1000 мкл пипеточный дозатор

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

ПБР – Протокол быстрого размножения

SDBB – Банк крови Сан-Диего

ОИЛ – опухоль-инфильтрирующие лимфоциты

T25–25-$см^2$ флакон для культивирования тканей

x g – «x ускорение свободного падения» – мера относительной центробежной силы

[00859] Образцы включают облученные донорские МКПК (SDBB).

Процедура

Вводная информация

7.1.1 Гамма-облученные, остановленные в росте питающие МК необходимы для современного стандартного ПБР ОИЛ. Мембранные рецепторы на питающих МК связывают анти-CD3 (клон OKT3) антитело и перекрестно связываются с ОИЛ во флаконе ПБР, стимулируя ОИЛ к размножению. Лоты питающих клеток получают путем лейкафереза цельной крови от отдельных доноров. Лейкаферезный препарат центрифугируют в градиенте плотности фиколл-пак, промывают, облучают и криоконсервируют в условиях GMP.

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

7.2.1 Критерием оценки для лотов облученных МКПК является отсутствие у них способности к репликации.

Дизайн эксперимента

7.3.1 Лоты питающих клеток тестируют в формате мини-ПБР, как если бы их совместно культивировали с ОИЛ, используя флаконы для культивирования тканей T25 в вертикальном положении.

7.3.1.1 Контрольный лот: один лот облученных МКПК, который, как уже было показано, соответствует критерию 7.2.1, тестируют наряду с экспериментальными лотами в качестве контроля.

7.3.2 Для каждого тестируемого лота облученных донорских МКПК используют флаконы-дубликаты.

Протокол эксперимента

[00860] Все процедуры культивирования тканей, описанные в данном протоколе, выполняют в условиях стерильности в БББ.

День 0

7.4.1 Готовят ~90 мл среды CM2 для каждого тестируемого лота донорских МКПК. Поддерживают CM2 теплой в водяной бане с температурой 37°C.

7.4.2 Размораживают аликвоту $6x10^6$ МЕ/мл IL-2.

7.4.3 Возвращают среду CM2 в БББ, потирают 70% EtOH перед помещением в ламинарный шкаф. Для каждого тестируемого лота МКПК отбирают примерно 60 мл CM2 в отдельный стерильный флакон. Добавляют IL-2 из размороженного $6x10^6$ МЕ/мл маточного раствора в данную среду до конечной концентрации 3000 МЕ/мл. Маркируют этот флакон как «CM2/IL2» (или аналогичным образом) чтобы отличать ее от CM2 без добавок.

7.4.4 Маркируют два флакона T25 для каждого тестируемого лота МКПК. Минимальная информация на этикетке включает:

7.4.4.1 Номер лота

7.4.4.2 Номер флакона (1 или 2)

7.4.4.3 Дату начала культивирования (день 0)

Подготовка OKT3

7.4.5 Извлекают маточный раствор анти-CD3 (OKT3) из холодильника с температурой 4°C и помещают в БББ.

7.4.6 Используют конечную концентрацию 30 нг/мл OKT3 в среде для мини-ПБР.

7.4.7 Готовят 10 мкг/мл рабочий раствор анти-CD3 (OKT3) из 1 мг/мл маточного раствора. Помещают в холодильник до использования.

7.4.7.1 Для каждого тестируемого лота МКПК готовят 150 мкл анти-CD3 (OKT3), разведенного 1:100 из маточного раствора.

Например, для одновременного тестирования 4 лотов МКПК готовят 600 мкл анти-CD3 (OKT3) 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

7.4.8 Добавляют 19 мл на флакон CM2/IL-2 в маркированные флаконы T25 и помещают флаконы в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5%

CO_2 на время подготовки клеток.

Подготовка облученных МКПК

7.4.9 Работают с каждым лотом донорских МКПК отдельно во избежание потенциального перекрестного загрязнения лотов.

7.4.10 Извлекают флаконы с тестируемыми лотами МКПК из хранилища с LN_2. Помещают их на -80°C или хранят на сухом льду до размораживания.

7.4.11 Помещают 30 мл CM2 (без IL-2) в 50-мл конические пробирки для каждого размораживаемого лота. Маркируют каждую пробирку разными номерами лотов размораживаемых МКПК. Плотно закрывают пробирки и помещают в водяную баню с температурой 37°C до использования. По мере необходимости, возвращают 50-мл конические пробирки в БББ, протирая 70% EtOH перед помещением в ламинарный шкаф.

7.4.12 Извлекают флакон с МКПК из холодного хранилища и помещают в плавучий штатив для пробирок в водяной бане с температурой 37°C для размораживания. Оставляют размораживаться до тех пор, пока во флаконе не останется небольшой кусок льда.

7.4.13 Опрыскивают или протирают размороженный флакон 70% EtOH и переносят в ББВ.

7.4.14 Используя стерильную пипетку для переноса, немедленно переносят содержимое флакона в 30 мл CM2 в 50-мл конической пробирке. Отбирают примерно 1 мл среды из пробирки для промывания флакона; возвращают смыв в 50-мл коническую пробирку. Плотно закрывают и осторожно вращают, промывая клетки.

7.4.15 Центрифугируют при 400xg в течение 5 мин при комнатной температуре.

7.4.16 Удаляют аспирацией супернатант и ресуспендируют клеточный осадок в 1 мл теплой CM2/IL-2, используя 1000-мкл пипетку с наконечником. Альтернативно, перед добавлением среды ресуспендируют клеточный осадок путем протаскивания закрытой пробирки вдоль пустого штатива для пробирок. После ресуспендирования клеточного осадка доводят объем до 4 мл средой CM2/IL-2. Записывают объем.

7.4.17 Отбирают небольшую аликвоту (например, 100 мкл) для подсчета клеток при помощи автоматического счетчика клеток.

7.4.17.1 Выполняют подсчет клеток в двух повторах в соответствии с СОП для конкретного автоматического счетчика клеток. Скорее всего, будет необходимо разбавлять МКПК перед проведением подсчета клеток. Рекомендованное начальное разведение составляет 1:10, однако оно может варьироваться в зависимости от типа используемого счетчика клеток.

7.4.17.2 Записывают количества клеток.

7.4.18 Доводят концентрацию МКПК до $1,3x10^7$ клеток/мл в соответствии с рабочим бланком на этапе 7.4.15.2, используя среду CM2/IL-2. Тщательно перемешивают, осторожно вращая или осторожно отбирая и выпуская жидкость серологической пипеткой.

Подготовка флаконов для культивирования

7.4.19 Возвращают два маркированных флакона T25 в ББББ из инкубатора для культивирования тканей.

7.4.20 Возвращают флакон анти-CD3/OKT3 с концентрацией 10 мкг/мл в ББББ.

7.4.21 Добавляют 1 мл клеточной суспензии МКПК в концентрации $1,3x10^7$ в каждый флакон.

7.4.22 Добавляют 60 мкл 10 мкг/мл анти-CD3/OKT3 в каждый флакон.

7.4.23 Возвращают закрытые флаконы в инкубатор для культивирования тканей на 14 дней непотревоженного роста.

7.4.24 Помещают флакон с анти-CD3/OKT3 обратно в холодильник до работы со следующим лотом.

7.4.25 Повторяют этапы 7.4.9–7.4.24 для каждого оцениваемого лота МКПК.

День 14, определение отсутствия пролиферации МКПК

7.4.26 Работая отдельно с каждым лотом, осторожно возвращают флаконы-дубликаты T25 в ББББ.

7.4.27 Используя для каждого флакона свежую 10-мл серологическую пипетку, отбирают ~17 мл из каждого флакона, затем осторожно отбирают оставшуюся среду для измерения остаточного объема во флаконах. Записывают объем.

7.4.28 Тщательно перемешивают образец пипетированием вверх-вниз, используя ту же серологическую пипетку.

7.4.29 Отбирают 200-мкл образец из каждого флакона для подсчета клеток.

7.4.30 Подсчитывают клетки при помощи автоматического счетчика клеток.

7.4.31 Повторяют этапы 7.4.26–7.4.31 для каждого оцениваемого лота МКПК.

РЕЗУЛЬТАТЫ И КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ

Результаты

10.1.1 Ожидается, что доза гамма-излучения достаточна для лишения питающих клеток способности к репликации. Ожидается, 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

10.2.1 Соответствие следующим критериям приемлемости отмечают для каждого протестированного лота облученных донорских МКПК:

10.2.2 «Отсутствие роста» – означает, что общее количество жизнеспособных клеток в день 14 является меньшим, чем количество жизнеспособных клеток в момент начала культивирования в день 0 ПБР.

10.2.3 В случае несоответствия лота критериям, приведенным выше, лот тестируют повторно в соответствии с планом действий в чрезвычайных ситуациях, изложенным в разделе 10.4.

10.2.4 После тестирования не соответствующего критериям лота, любой лот питающих клеток МК, который не соответствует критериям приемлемости как при первоначальной оценке, так и повторном тестировании, исключают.

Экстренное тестирование лотов МКПК, не соответствующих критериям приемлемости.

10.4.1 В случае, если лот облученных донорских МКПК не соответствует критериям приемлемости, приведенным выше, проводят следующие этапы для повторного тестирования лота с целью исключения вероятности того, что причиной является простая ошибка эксперимента.

10.4.2 Если имеются два или более отдельных тестируемых флаконов из лота, тогда лот тестируют повторно. Если остается один, или не остается ни одного, из тестируемых флаконов из лота, тогда считают, что лот не соответствует критериям приемлемости, приведенным выше в разделе 10.2.

10.4.3 Когда это возможно, два квалифицированных сотрудника (предпочтительно, включая первого сотрудника, оценивающего сомнительный лот) тестируют два отдельных флакона независимо. Это является предпочтительным методом экстренного тестирования. За исключением отдельных флаконов МКПК, оба сотрудника могут использовать одни и те же реагенты.

10.4.3.1. Если невозможно привлечь двух сотрудников, один сотрудник проводит тестирование двух флаконов МКПК для несоответствующего критериям лота, работая отдельно с каждым флаконом.

10.4.4 Повторяют действия, описанные в разделе 7.4 «Протокол эксперимента» для повторной оценки сомнительного лота.

10.4.5 Помимо сомнительного лота, каждый сотрудник, выполняющий экстренное тестирование, тестирует контрольный лот.

10.4.5.1 Если два сотрудника выполняют экстренное тестирование, оба сотрудника тестируют контрольный лот независимо.

10.4.5.2 Если только один сотрудник может выполнять экстренное тестирование, нет необходимости в тестировании контрольного лота в двух повторах.

10.4.5.3 Чтобы выдержать проверку на соответствие критериям, для лота МКПК, подвергаемого экстренному тестированию, необходимо, чтобы как контрольный лот, так и обе реплики сомнительного лота, соответствовали критериям приемлемости, изложенным в разделе 10.2.

10.4.5.4 В случае соответствия критериям, лот затем передают для дальнейшего использования в КПО, как описано в разделе 10.2.

ПРИМЕР 15: Цитометр с визуализацией, автоматический счетчик клеток Cellometer IC2

[00861] В данном примере описана процедура для работы с цитометром с визуализацией, автоматическим счетчиком клеток Cellometer K2.

1. Определения

мкл - микролитр

AOPI - аридин оранжевый – пропидия йодид

БББ - бокс биологической безопасности

DPBS - фосфатно-солевой буфер Дульбекко

мл - миллилитр

МК - мононуклеарные клетки крови

Н/П - не применимо

МКПК - мононуклеарные клетки периферической крови

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

Пре-ПБР – начальное культивирование ОИЛ, предваряющее культивирование на этапе протокола быстрого размножения

ПБР – протокол быстрого размножения

ОИЛ - опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

7. Процедура

7.1 Приготовление клеточной суспензии

7.1.1 Приготовление трипанового синего

Конечная концентрация трипанового синего составляет 0,1%. Производитель рекомендует готовить маточный раствор с концентрацией 0,2%.

7.1.1.1 При использовании трипанового синего в Cellometer K2 разбавляют меточный раствор (0,4%) PBS до 0,2%.

7.1.1.2 Фильтруют трипановый синий через 0,2-0,4-микронный фильтр и разделяют на аликвоты небольшого объема в маркированные пробирки с крышками.

7.1.1.3 Смешивают клеточную суспензию в соотношении 1:1 с 0,2% раствором трипанового синего.

7.1.2 Приготовление AOPI

7.1.2.1 Для использования AOPI в Cellometer K2, готовят раствор AOPI.

7.1.2.2 Окрашивают образец клеток раствором AOPI в соотношении 1:1.

Примечание: при подсчете клеток в высококонцентрированной культуре разбавляют образцы клеток в среде для культивирования клеток до проведения конечного разбавления 1:1 трипановым синим или AOPI.

Используют предлагаемый производителем диапазон подсчитываемых клеток для определения наилучшего разведения.

7.2 Настройка Cellometer K2

7.2.1 Включают прибор Cellometer K2.

7.2.2 Выбирают иконку цитометра с визуализацией Cellometer на мониторе подключенного компьютера.

7.2.3 На главном экране выбирают один из анализов, перечисленных в выпадающем меню.

7.2.3.1 При выборе соответствующего анализа поля «тип клеток» и «графический режим» заполняются автоматически.

7.2.3.2 В разделе «образец» нажимают на «указать идентификатор пользователя/образца» для открытия другого экрана, где вносят информацию оператора относительно образца.

7.2.3.2.1 Вводят «идентификатор пользователя». Он будет состоять из трехбуквенных инициалов пользователя.

7.2.3.2.2 Вводят «идентификатор образца». Идентификатор образца получают из входящей информации об образце.

7.2.3.3 Настройка параметров разведения.

7.2.3.3.1 Если не было другого разведения, кроме смеси 1:1, коэффициент разведения составляет 2.

7.2.3.3.2 Если было выполнено разведение помимо конечной смеси 1:1, коэффициент разведения равен 2-кратному предшествующему разведению.

7.2.3.3.3 Обновляют коэффициент разведения в соответствии со смесью, указанной в секции «разведение» экрана. Нажимают на иконку карандаша для вызова диалоговых окон.

7.2.3.3.4 Убеждаются, что секции изображение F1 и изображение F2 идентичные.

7.2.3.3.5 Нажимают кнопку «сохранить» после завершения настроек.

7.3 Подсчет клеток

7.3.1 Удаляют пластиковую подложку с обеих сторон счетной слайд-камеры Cellometer (SD100) и помещают ее поверх чистой, безворсовой салфетки.

7.3.2 После приготовления клеточной суспензии отбирают небольшую аликвоту образца и переносят ее в лунку многолуночного планшета для культивирования клеток или в пробирку.

7.3.3 В случае разведения образца, производят разведение, используя среду для культивирования клеток.

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

7.3.5 Добавляют 20 мкл 0,2% раствора трипанового синего или раствора AOPI к 20 мкл клеточной суспензии и тщательно перемешивают образец.

7.3.6 Отбирают 20 мкл смешанного 1:1 раствора и переносят его на одну сторону счетной камеры.

Примечание: избегают прикосновений к прозрачной области слайд-камеры.

7.3.7 При необходимости, повторно наносят образец на другую сторону слайд-камеры. Вставляют камеру в гнездо на передней части Cellometer.

7.3.8 Для подсчета клеток с AOPI нажимают на «предварительный просмотр F1» на главном экране для предварительного просмотра зеленого флуоресцентного изображения (живых клеток). Для подсчета клеток с трипановым синим нажимают на «предварительный просмотр в светлом поле».

7.3.9 7.3.9. Используя колесо фокусировки, добиваются оптимальной фокусировки изображения. Клетки имеют светлый центр и четко очерченные края.

7.3.10 Нажимают «счет» для начала процесса подсчета.

7.3.11 Результаты отображаются во всплывающем окне «результаты подсчета» на экране компьютера, демонстрируя результаты процесса подсчета.

Пример 16: Приготовление маточного раствора IL-2 (CellGenix)

[00862] 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.

3. Определения/Сокращения

мкл - микролитр

БББ - бокс биологической безопасности

УББ2 - уровень 2 биологической безопасности

DPBS - фосфатно-солевой буфер Дульбекко

G - калибр

GMP – Надлежащая производственная практика

HAc - уксусная кислота

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

мл - миллилитр

Н/П – не применимо

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

rhIL-2; IL-2 - рекомбинантный человеческий интерлейкин-2

СОА – сертификат анализа

6. Процедура

6.1 Готовят 0,2% раствор уксусной кислоты (HAc).

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

6.1.2 Добавляют 1 мл 1Н уксусной кислоты в 50-мл коническую пробирку.

6.1.3 Тщательно перемешивают, переворачивая пробирку 2-3 раза.

6.1.4 Стерилизуют раствор HAc фильтрованием, используя фильтр Steriflip.

6.1.5 Закрывают, ставят дату и маркируют раствор «стерильный 0,2% раствор уксусной кислоты».

6.1.6 Срок годности раствора истекает через 2 месяца. Хранят при комнатной температуре.

6.2 Готовят 1% раствор ЧСА в PBS.

6.2.1 Добавляют 4 мл 25% маточного раствора ЧСА к 96 мл PBS в 150-мл стерильной фильтровальной ячейке.

6.2.2 Фильтруют раствор.

6.2.3 Закрывают, ставят дату и маркируют раствор «1% ЧСА в PBS».

6.2.4 Срок годности раствора истекает через 2 месяца. Хранят при 4°C.

6.3 Для каждого приготовленного флакона rhIL-2 заполняют формы.

6.4 Готовят маточный раствор rhIL-2 (конечная концентрация $6x10^6$ МЕ/мл).

6.4.1 Все лоты rh1-л-2 являются разными, и для них необходимо находить информацию в подготовленном производителем сертификате анализа (СОА), такую как:

6.4.1.1 Масса rhIL-2 в каждом флаконе (мг)

6.4.1.2 Удельная активность rhIL-2 (МЕ/мг)

6.4.1.3 Рекомендованный объем для восстановления 0,2% HAc (мл)

6.4.2 Рассчитывают объем 1% ЧСА, необходимый для лота rhIL-2, используя приведенную ниже формулу:

$$\left(\frac{\text{Масса флакона (мг)} \times \text{Биологическая активность } \left(\frac{\text{МЕ}}{\text{мг}}\right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{МЕ}}{\text{мл}}}\right) - \text{HAc об. (мл)} = 1\%\ \text{ЧСА об. (мл)}$$

6.4.2.1 Например, в соответствии с COA лота 10200121 rhIL-2 CellGenix, удельная активность для 1-мг флакона составляет $25x10^6$ МЕ/мг. Рекомендовано восстанавливать rhIL-2 в 2 мл 0,2% HAc.

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

6.4.3 Протирают пробку флакона с IL-2 спиртовой салфеткой.

6.4.4 Используя иглу 16G, прикрепленную к 3-мл шприцу, инъецируют рекомендованный объем 0,2% HAc во флакон. Следует проявлять осторожность, чтобы не сдвигать пробку при извлечении иглы.

6.4.5 Переворачивают флакон 3 раза и вращают до полного растворения порошка.

6.4.6 Осторожно вынимают пробку и откладывают в сторону на спиртовую салфетку.

6.4.7 Добавляют рассчитанный объем 1% ЧСА во флакон.

6.4.8 Закрывают флакон резиновой пробкой.

6.5 Хранение раствора rhIL-2

6.5.1 Для краткосрочного хранения (<72 часов) хранят флакон при 4°C.

6.5.2 Для долгосрочного хранения (>72 часов) разделяют содержимое флакона на аликвоты более мелкого объема и хранят в криопробирках при -20°C до использования. Избегают циклов замораживания/размораживания. Срок годности составляет 6 месяцев с даты изготовления.

6.5.3 Этикетки для rh-IL-2 включают название поставщика и каталожный номер, номер лота, срок годности, инициалы оператора, концентрацию и объем аликвоты.

ПРИМЕР 17: Приготовление среды для процессов пре-ПБР И ПБР

[00863] 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.

3. Определения

мкг - микрограмм

мкм - микрометр

мкМ - микромолярный

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

БББ - бокс биологической безопасности

СМ1 полная среда № 1

СМ2 полная среда № 2

СМ3 полная среда № 3

СМ4 полная среда № 4

МЕ или Ед – международные единицы

мл - миллилитр

мМ - миллимолярный

Н/П – не применимо

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

Пре-ПБР – начальное культивирование ОИЛ, предваряющее культивирование на этапе протокола быстрого размножения

ПБР - процесс быстрого размножения

rhIL-2, IL-2 - рекомбинантный человеческий интерлейкин-2

RPMI 1640 – среда Roswell Park Memorial Institute, препарат 1640

СОП - стандартная операционная процедура

ОИЛ - опухоль-инфильтрирующие лимфоциты.

7. Процедура

7.1 Все процедуры выполняют в стерильных условиях в БББ (класс II, тип А2).

7.1.1 Перед использованием ламинарного шкафа опрыскивают его поверхность 70% этанолом.

7.1.2 Опрыскивают все предметы и реагенты 70% этанолом перед помещением их в ламинарный шкаф для культивирования тканей.

7.2 Разделяют на аликвоты 200 мМ раствор L-глутамина.

7.2.1 L-глутамин поставляется в больших объемах, чем нужно для приготовления среды (например, объемах 100 мл или 500 мл).

7.2.2 Размораживают флаконы с L-глутамином в водяной бане с температурой 37°С.

7.2.3 Тщательно перемешивают L-глутамин после размораживания, поскольку он выпадает в осадок после размораживания. Убеждаются, что весь осадок вновь перешел в раствор, перед разделением раствора на аликвоты.

7.2.4 Помещают 5-10-мл аликвоты L-глутамина в стерильные 15-мл конические пробирки.

7.2.5 Записывают на этикетке концентрацию, поставщика, номер лота, дату

разделения на аликвоты и срок годности.

7.2.6 Затем пробирки хранят при -20°C и вынимают во время приготовления среды.

7.3 Приготовление CM1

7.3.1 Извлекают следующие реагенты из холодного хранилища и нагревают их в водяной бане с температурой 37°C:

7.3.1.1 RPMI 1640

7.3.1.2 человеческая AB сыворотка

7.3.1.3 200 мМ L-глутамин

7.3.2 Извлекают BME из хранилища с температурой 4°C и помещают в ламинарный шкаф для культивирования тканей.

7.3.3 Переносят маточный раствор гентамицина из хранилища с комнатной температурой в ламинарный шкаф для культивирования тканей.

7.3.4 Готовят среду CM1 в соответствии с Таблицей 23, ниже, добавляя каждый из ингредиентов в верхнюю камеру 0,2-мкм фильтровальной ячейки в соответствующем объеме для фильтрования.

ТАБЛИЦА 23. Приготовление CM1

Ингредиент	**Конечная концентрация**	**Конечный объем 500 мл**	**Конечный объем 1 л**
RPMI 1640	Н/П	450 мл	900 мл
Человеческая AB сыворотка, инактивированная нагреванием, 10%	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ BME	55 мкМ	0,5 мл	1 мл
50 мг/мл гентамицин сульфат	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

7.3.5 Записывают на этикетке флакона со средой CM1 ее название, инициалы приготовившего ее сотрудника, дату фильтрования/приготовления, двухнедельный срок годности, и хранят при 4°C до использования в культивировании тканей. Среду можно разделять на аликвоты во флаконы меньшего размера, по мере необходимости.

7.3.6 Любые остатки RPMI 1640, человеческой AB сыворотки, или L-глутамина хранят при 4°C до следующего приготовления среды.

7.3.7 Флакон с маточным раствором BME возвращают в хранилище с температурой 4°C.

7.3.8 Флакон с маточным раствором гентамицина возвращают в надлежащее хранилище с RT.

7.3.9 Из-за ограниченной буферной емкости среды СМ1 не используют, если после изготовления прошло более двух недель или индикатор pH феноловый красный показывает очень сильный сдвиг pH (от ярко-красного до розового окрашивания).

7.3.10 В день использования предварительно нагревают нужное количество СМ1 в водяной бане с температурой 37°С и добавляют 6000 МЕ/мл IL-2.

7.3.11 Дополнительные добавки - по мере необходимости

7.3.11.1 СМ1 с добавлением GlutaMAX®

7.3.11.1.1 СМ1 можно готовить, используя 2 мМ GlutaMAX™ вместо 2 мМ глутамина (конечная концентрация, смотри Таблицу 2.) В этом случае указывают на этикетке флакона со средой, на этапе 7.3.5, выше, что добавлено «2 мМ GlutaMAX», чтобы не путать со стандартным составом СМ1.

7.3.11.2 СМ1, с добавлением дополнительного антибиотика/антимикотика

7.3.11.2.1 Для некоторых составов СМ1 необходим дополнительный антибиотик или антимикотик для предотвращения загрязнения пре-ПБР ОИЛ, растущих из опухолей некоторых типов.

7.3.11.2.2 Конечные концентрации добавленного антибиотика/антимикотика приведены в Таблице 24, ниже.

7.3.11.2.3 В этом случае указывают на этикетке флакона со средой, на этапе 7.3.1, выше, название(я) дополнительного антибиотика/антимикотика, чтобы не путать со стандартным составом СМ1.

ТАБЛИЦА 24. 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

7.4 Приготовление СМ2

7.4.1 Извлекают готовую СМ1 из холодильника или готовят свежую СМ1, как описано в разделе 7.3, выше.

7.4.2 Извлекают AIM-V® из холодильника.

7.4.3 Готовят необходимое количество СМ2 путем смешивания готовой СМ1 с равным объемом AIM-V® в стерильном флаконе для среды.

7.4.4 Добавляют 3000 МЕ/мл IL-2 к среде СМ2 в день использования.

7.4.5 Готовят достаточное количество СМ2 с 3000 МЕ/мл IL-2 в день

использования.

7.4.6 Записывают на этикетке флакона со средой СМ2 ее название, инициалы приготовившего ее сотрудника, дату фильтрования/приготовления, двухнедельный срок годности, и хранят при 4°С до использования в культивировании тканей. Среду разделяют на аликвоты во флаконы меньшего размера, по мере необходимости.

7.4.7 Возвращают всю СМ2 без IL-2 в холодильник, где ее можно хранить до двух недель, или до тех пор, когда индикатор pH феноловый красный покажет очень сильный сдвиг pH (от ярко-красного до розового окрашивания).

7.5 Приготовление СМ3

7.5.1 Готовят СМ3 в день, когда она должна быть использована.

7.5.2 СМ3 представляет собой среду AIM-V® с добавлением 3000 МЕ/мл IL-2 в день использования.

7.5.3 Готовят количество СМ3, достаточное для эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 непосредственно во флакон или мешок с AIM-V®. Тщательно перемешивают осторожным встряхиванием. Записывают на этикетке флакона «3000 МЕ/мл IL-2» сразу после его добавления в AIM-V®. Если остается лишняя СМ3, ее хранят во флаконах при 4°С с этикеткой, на которой указано название среды, инициалы приготовившего ее сотрудника, дата приготовления среды и срок годности (7 дней после приготовления).

7.5.4 Выбрасывают среду с добавленным IL-2 после 7 дней хранения при 4°С.

7.6 Приготовление СМ4

7.6.1 СМ4 представляет собой СМ3 с дополнительной добавкой 2 мМ GlutaMAX™ (конечная концентрация).

7.6.1.1 Для каждого 1 л СМ3 добавляют 10 мл 200 мМ GlutaMAX™.

7.6.2 Готовят количество СМ4, достаточное для эксперимента, путем добавления маточного раствора IL-2 и маточного раствора GlutaMAX™ непосредственно во флакон или мешок с AIM-V®. Тщательно перемешивают осторожным встряхиванием.

7.6.3 Записывают на этикетке флакона «3000 МЕ/мл IL-2 и GlutaMAX» сразу после добавления к AIM-V®.

7.6.4 Если остается лишняя СМ4, ее хранят во флаконах при 4°С с этикеткой, на которой указано название среды, «GlutaMAX», инициалы приготовившего ее сотрудника, дата приготовления среды и срок годности (7 дней после приготовления).

7.6.5 Выбрасывают среду с добавленным IL-2 после 7 дней хранения при 4°С.

ПРИМЕР 18: Окрашивание поверхностных антигенов пост-ПБР ОИЛ

1. Цель эксперимента

[00864] В данном примере описан способ окрашивания поверхностных антигенов пост-ПБР ОИЛ методом проточной цитометрии. Данный способ можно применять к любым ОИЛ, описанным в настоящей заявке и в примерах.

[00865] **Ключевые термины и определения**

α - альфа

β - бета

мкл - микролитр

APC - аллофикоцианин

Ax647 - Alex Fluor 647

BD – компания Becton Dickinson

БСА - бычий сывороточный альбумин

БББ - бокс биологической безопасности

BV421 – бриллиантовый фиолетовый 421

CD - кластер дифференцировки

CST – настройка цитометра и отслеживание

Cy - цианин

DPBS - фосфатно-солевой буфер Дульбекко

FACS - сортировщик клеток с активированной флуоресценцией

ЭБС - эмбриональная бычья сыворотка

FITC - флуоресцеин изотиоцианат

FMO: флуоресценция с комбинацией детектируемых меток без одной

г - грамм

H7 - аналог Cy7

Мл – миллилитр

PE - фикоэритрин

PerCP-Cy5.5 - перидинин-хлорофилл белковый комплекс

ИСЗ – индивидуальные средства защиты

ПБР – протокол быстрого размножения

SIT – пробирка для впрыска образца

TCR – Т-клеточный рецептор

масс/об – масса к объему.

Антитела и красители для проточной цитометрии

ТАБЛИЦА 25: Краситель Aqua Live/Dead; ThermoFisher каталожный № L34966.

Мишень	**Формат**	**Клон**	**Поставщик**	**Каталожный номер**
TCRab (то есть, TCR α/β)	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622
CD28	PE	CD28,2	BioLegend	302908
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42
CD27	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U

CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033
CD45R A	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032
CCR7	PE	150503	BD Biosciences	560765
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318
CD38	APC	HB-7	BioLegend	356606
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633
CD69	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745
TIGIT	PE	МБСА43	eBioscience	12-9500-42
KLRG1	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704
CD154	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886
CD137	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818
Lag3	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42
PD1	APC	EH12,2H 7	BioLegend	329908
Tim-3	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008

7. Процедура

7.1 Подготовка реагентов

7.1.1 Промывающий FACS-буфер

7.1.1.1 Добавляют 2% (масс/об) инактивированной нагреванием ЭБС к DPBS (добавляют 10 мл ЭБС к 490 мл 1X DPBS).

7.1.1.2 Добавляют 0,1% (масс/об) NaN_3 (76,9 мкл в 500-мл флакон).

7.1.1.3 Раствор хранят при 4°C. Выбрасывают через 30 дней.

7.1.2 Краситель Aqua

7.1.2.1 Добавляют 50 мкл ДМСО во флакон с реакционноспособным красителем.

7.1.2.2 Тщательно перемешивают и визуально убеждаются, что краситель растворился.

7.1.2.3 Краситель, не используемый для процедуры, разделяют на аликвоты и замораживают при 20°C до следующего использования. Нельзя замораживать/размораживать повторно.

7.1.3 Приготовление коктейля антител.

7.1.3.1 Коктейль готовят в полипропиленовых пробирках, таких как пробирки эппендорф.

7.1.3.2 Коктейль хранят до 6 месяцев.

Таблица 26: Панель 1 дифференцировки (DF1):

Мишень	**Формат**	**Клон**	**Поставщик**	**Каталожный номер**	**Титр**
TCRab (то	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3

есть, TCR α/β)					
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	BioLegend	302908	2
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222	3
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033	2
FACS-буфер					33

Таблица 27: Панель 2 дифференцировки (DF2):

Мишень	**Формат**	**Клон**	**Поставщик**	**Каталожный номер**	**Титр**
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CCD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
CCCR7*	PE	150503	BD Biosciences	560765	5
CCD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CCD4	APC/Cy7	OKT4	BioLegend	317418	2
CCD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HHLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
FACS-буфер					35

Таблица 28: Панель 1 активации Т-клеток (Tact1)

Мишень	**Формат**	**Клон**	**Поставщик**	**Каталожный номер**	**Титр**
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
Lag3*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
PD1*	APC	EH12,2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
FACS-буфер					33

Таблица 29: Панель 2 активации Т-клеток (Tact2)

Мишень	Формат	Клон	Поставщик	Каталожный номер	Титр
CD69*	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745	3
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	BD Biosciences	552852	2
TIGIT*	PE	МБСА43	eBioscience	12-9500-42	3
CD8	FITC	HIT8	BioLegend	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	BioLegend	317418	2
KLRG1*	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
FACS-буфер					34

7.2 Требования для проточно-цитометрического анализа

7.2.1 Калибровка проточного цитометра

7.2.1.1 Проточный цитометр калибруют в день выполнения анализа, используя CST гранулы, в соответствии с инструкциями производителя.

7.2.1.2 Оператор убеждается, что проточный цитометр прошел калибровку с надлежащей проверкой параметров и базового уровня.

7.2.2 Компенсация/FMO контроли

7.2.2.1 Одноцветные образцы для компенсации готовят, используя гранулы для компенсации BD и набор гранул ArC™ Amine Reactive Compensation Bead Kit.

7.2.2.2 FMO контроль, содержащие клетки образцы окрашивают коктейлем антител, за вычетом следующего конъюгата одного антитела, CD27, CD28 и CD57.

7.2.3 Стандартизация СИФ

7.2.3.1 Напряжение цитометра определяют ежедневно, используя контрольные гранулы и целевые значения напряжения.

7.3 Окрашивание образца

7.3.1 Маркируют пробирки для FACS: название образца-DF1, название образца-DF2, название образца-T1, название образца-T2.

7.3.2 Маркируют один набор FMO контролей: CD27-APC-H7, CD28-PE, CD57-PerCPCy5.5, CD45RA-PECy7, CCR7-PE, CD38-APC, CD137-PE7, Lag3-PE, PD1 APC, Tim3-BV421, CD69-PE7, TIGIT-PE, KLRG1-Ax647 и CD154-BV421.

7.3.3 Добавляют 0,5-2 миллионов клеток в каждую пробирку.

7.3.4 QS до 3 мл 1x PBS в каждую пробирку.

7.3.5 Центрифугируют пробирки при 400xg, с высоким ускорением и тормозом, в течение 5 минут.

7.3.6 Пока образцы центрифугируются, готовят краситель Aqua, метящий мертвые клетки.

7.3.7 Извлекают аликвоту Aqua из морозильной камеры и разбавляют 1/200 в PBS. Хранят в темноте. Добавляют 2 мкл красителя к 198 мкл DPBS.

7.3.8 Декантируют или удаляют аспирацией супернатант из пробирок этапа 7.3.5.

7.3.9 Добавляют 25 мкл раствора Aqua, описанного выше, к образцам и FMO контролям.

7.3.10 Инкубируют в течение 15 минут при комнатной температуре (RT) в темноте.

7.3.11 Примечание: если клетки исходно хранили в не содержащей белок среде, тогда следует добавлять этап блокирования, например, 5 мкл TruStain в течение 10 минут при комнатной температуре.

7.3.12 Добавляют 50 мкл коктейлей антител в соответствующие пробирки.

7.3.13 Встряхивают штатив с пробирками для перемешивания.

7.3.14 Инкубируют в течение 15 минут при RT в темноте.

7.3.15 Записывают время начала и окончания. Добавляют 3 мл промывающего FACS-буфера.

7.3.16 Центрифугируют пробирки при 400 x g, с высоким ускорением и тормозом, в течение 5 минут.

7.3.17 После завершения центрифугирования декантируют или удаляют аспирацией супернатант.

7.3.18 Ресуспендируют клетки путем протаскивания пробирок вдоль пустого штатива.

7.3.19 Добавляют 100 мкл 1% раствора параформальдегида в каждую пробирку.

7.3.20 Хранят при 40°C в темноте до момента передачи в проточный цитометр.

Примечание: образцы можно хранить до 72 часов.

7.4 Компенсационный контроль L/D Aqua.

7.4.1 Маркируют пробирки для FACS «компенсационный контроль L/D Aqua».

7.4.2 Добавляют одну каплю гранул Arc в пробирку.

7.4.3 Добавляют 3 мкл L/D Aqua непосредственно к гранулам.

7.4.4 Инкубируют пробирки при комнатной температуре в темноте в течение 10-30 мин.

7.4.5 Записывают время начала и окончания инкубации на рабочем бланке.

7.4.6 После инкубации добавляют 3 мл промывающего FACS-буфера в каждую пробирку.

7.4.7 Центрифугируют пробирки при 400 x g, с высоким ускорением и тормозом, в течение 5 минут.

7.4.8 Декантируют или удаляют аспирацией супернатант.

7.4.9 Ресуспендируют содержимое пробирок в 500 мкл 1% раствора PFA. Добавляют 1 каплю «отрицательных» гранул. Помещают на 40°C в темное место до использования.

7.5 Окрашивание компенсационного контроля.

7.5.1 Маркируют пробирки для FACS, как указано в рабочем бланке для

фенотипирования пост-ПБР ОИЛ.

7.5.2 Добавляют антитела, как указано в рабочем бланке для фенотипирования пост-ПБР ОИЛ.

7.5.3 После инкубации добавляют 3 мл FACS-буфера в каждую пробирку.

7.5.4 Центрифугируют пробирки при 500 x g, с высоким ускорением и тормозом, в течение 2 минут.

7.5.5 Декантируют или удаляют аспирацией супернатант.

7.5.6 Ресуспендируют содержимое пробирок в 500 мкл 1% раствора PFA в PBS и хранят при 2-80°C в темноте.

7.6 Получение данных

7.6.1 Открывают программу FACSDiva и выполняют вход.

7.6.2 В диалоговом окне «несовпадений» цитометра нажимают «использовать настройки CST».

7.6.3 Создают новый файл эксперимента, нажимая на табличку «эксперимент» и выбирая матрицу «расширенный фенотип».

7.6.4 Дважды нажимают на «целевые показатели» эксперимента и корректируют значения напряжения для достижения целевых значений, определяемых оператором ядра потока.

7.6.5 Копируют настройки инструмента и вводят их в поле нового эксперимента.

7.6.6 Создают образец для каждой отдельной пробы и называют их соответственно.

7.6.7 Создают названия для образцов в соответствии с маркировкой на их пробирках.

7.6.8 Осторожно перемешивают на вихревой мешалке или слегка постукивают пальцем перед установкой пробирки в SIT.

7.6.9 Получают данные в поле «запись» платы сбора данных.

7.6.10 Прогоняют образцы со скоростью менее 7500 событий в секунду.

7.6.11 Собирают от 50000 до 100000 событий для живых клеток, исключая детрит.

ПРИМЕР 19: Разработка процесса верификации способа 2A

[00866] **Эксперименты в данном примере были проведены для анализа способа 2A производства ОИЛ из полученных от пациентов опухолей меланомы и опухоли молочной железы, включая разрастание ОИЛ из опухолей в процедуре пре-ПБР, а затем в модифицированной процедуре ПБР. Особое внимание уделено созданию замороженного препарата ОИЛ и сравнению эффективности замороженного препарата ОИЛ с препаратом ОИЛ, получаемым используемым в настоящее время способом (способом 1C). Настоящий отчет показывает, что у свежих и размороженных клеток имели место аналогичные профили при оценке важных атрибутов качества (количества клеток, % жизнеспособности, % CD3+ Т-клеток и стимулированного гранулами продуцирования гамма-интерферона (IFN-γ)), а также в процедуре расширенного фенотипирования при рестимуляции (ре-ПБР), независимо от того, был ли один и тот же препарат ОИЛ свежим или**

замороженным. Данные, приведенные в поддержку данного заключения, включают показатели пролиферации, жизнеспособности, фенотипа, секреции IFN-γ, активности, длины теломер и метаболической активности. Результаты характеризуют способ 2A, сокращенный процесс пре-ПБР/ПБР, с последующим криоконсервированием ОИЛ, а также позволяют сравнивать способ 2A с более длительным способом 1C, описанным в настоящем документе.

[00867] **Описание доноров опухолей, сроков обработки и мест обработки можно найти ниже в Таблице 1 (*указывает, что ПБР начинали, используя замороженную линию пре-ПБР ОИЛ):**

Таблица 30: Описание доноров опухолей, сроков обработки и мест обработки.

Опухоль	Тип ткани	Источник	Ткань
M1061	Меланома	MT group	Первичная - боковая часть левой стопы
M1062	Меланома	Moffitt	Н/П
M1063	Меланома	MT group	Метастатическая С – правая часть паха
M1064	Меланома	MT group	Метастатическая С - левая лодыжка
M1065	Меланома	Bio Options	Метастатическая - подмышечный лимфатический узел
EP11001	ER+PR+	MT group	Первичная - инвазивная протоковая карцинома левой молочной железы
M1056*	Меланома	Moffitt	Н/П
M1058*	Меланома	MT group	Метастатическая - стадия IIB, кожа правой стороны головы
M1023*	Меланома	Atlantic Health	Первичная - правая подмышка

3. Вводная информация

3.1 LN-144 представляет собой иммунотерапевтический препарат для лечения пациентов с метастатической меланомой. Препарат состоит из аутологичных опухоль-инфильтрирующих Т-лимфоцитов (ОИЛ), полученных от отдельного пациента после хирургической резекции опухоли и размноженных ex vivo путем культивирования клеток измельченных опухолевых фрагментов (пре-ПБР), с последующим быстрым размножением ОИЛ в присутствии высокой дозы IL-2, анти-CD3 и костимулирующих АПК. После предварительного прохождения немиелоаблативной лимфодеплеции пациент получает одну инфузию его/ее ОИЛ, с последующими внутривенными инфузиями альдеслейкина (IL-2) каждые 8 часов, максимально 6 доз. Исследования, включающие альтернативные способы размножения ОИЛ на фоне молекул ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов (DAMP) в микросреде опухоли (TNE), также продемонстрировали эффективное размножение Т-клеток, полезных для терапии (Donia 2014; Sommerville, 2012).

Способ 1C, используемый для коммерческого производства ОИЛ, включает схему

производства, которая может занимать ~45-55 дней для производства вводимого инфузией препарата ОИЛ, который доставляют пациенту, прошедшему иммунодеплецию, в пределах 24 часов. Иммунодеплеция пациента-реципиента должна быть точно сопряжена по времени со сбором клеток используемого в настоящее время препарата ОИЛ. Задержка процесса сбора или доставки свежего препарата может отрицательно сказаться на пациенте, прошедшем иммунодеплецию и ожидающем инфузию. Способ 2А усовершенствован относительно способа 1С за счет уменьшения времени производственного цикла и материалов вследствие сокращения продолжительности как пре-ПБР, так и ПБР, процессов. Кроме того, способ 2А допускает большую гибкость сроков доставки препарата. Отличия между способом 1С и способом 2А в процессах пре-ПБР, ПБР и сбора клеток (смотри Таблицу 2) включают:

3.1.1 Более крупные флаконы с большим содержанием опухолевых фрагментов, используемых в процедуре пре-ПБР.

3.1.2 Этапы, для которых используют закрытую систему, или которые в будущем могут быть адаптированы для закрытой системы.

3.1.3 Сокращенное количество дней как в пре-ПБР, так и в ПБР, процедурах.

3.1.4 Прямой переход к ПБР, устраняющий необходимость в предварительном фенотипировании пре-ПБР популяций для выбора конкретных популяций пре-ПБР ОИЛ, переводимых в ПБР.

3.1.5 Совместное культивирование с заранее определенным количеством облученных аллогенных АПК МКПК в сочетании с анти-CD3 (клон OKT3), рассчитанных для достаточного увеличения количества ОИЛ.

3.1.6 Автоматическая система промывания для сбора клеток.

3.1.7 Конечный препарат на основе CS10, криоконсервированный перед отправкой.

Таблица 31: Преимущества способа 2А над способом 1С.

Этап способа	**Способ 1С**	**Способ 2А**	**Преимущество**
Этап А: Получение образца опухоли пациента	После хирургической операции, можно замораживать после сбора и перед этапом В.	После хирургической операции, можно замораживать после сбора и перед этапом В.	Одинаково
Этап В: Первое размножение	Физическое фрагментирование 4 фрагмента на 10 флаконов G-REX 10 Продолжительность 11-21 дней Ростовая среда	Физическое фрагментирование 40 фрагментов на 1 флакон G-REX 100M Продолжительность 11 дней (диапазон от 3 дней до 14 дней)	Увеличенное количество опухолевых фрагментов на флакон Сокращенное время культивирования Сокращенное количество этапов

	содержит IL-2	Ростовая среда содержит IL-2	Возможность использования с закрытой системой
Этап C: Переход от первого размножения ко второму размножению	ОИЛ после этапа B замораживают до фенотипирования с целью отбора, затем размораживают для перехода к этапу D (~день 30) Для этапа D необходимо >40x10^6 ОИЛ	ОИЛ после этапа B непосредственно переносят в этап D в день 11 этапа B Для этапа D необходимо 25-200x10^6 ОИЛ	Сокращенный процесс перехода от пре-ПБР к ПБР Сокращенное количество этапов Исключение фенотипирования для отбора Возможность использования с закрытой системой
Этап D: Второе размножение	6 флаконов G-REX 100M в день 0 этапа D 5x10^6 ОИЛ и 5x10^8 антигенпредставляющих питающих клеток на флакон в день 0 этапа D Разделяют на 18-36 флаконов в день 7 этапа D Продолжительность этапа D 14 дней Ростовая среда содержит IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющие клетки	1 флакон G-REX 500M в день 11 этапа B 25-200x10^6 ОИЛ и 5x10^9 антигенпредставляющих питающих клеток в день 11 этапа B Разделяют на ≤6 флаконов G-REX 500M в день 16 Продолжительность этапа D 11 дней Ростовая среда содержит IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющие клетки	Сокращенное количество этапов Меньшая продолжительность ПБР Перенос ОИЛ между флаконами в закрытой системе Замена среды в закрытой системе
Этап E: Сбор ОИЛ	ОИЛ собирают центрифугированием	ОИЛ собирают при помощи автоматизированной системы промывания клеток LOVO	Сокращенное количество этапов Автоматизированное промывание клеток Закрытая система Уменьшение потерь

			препарата при промывании
Этап F: Окончательное формулирование/Перенос в инфузионный мешок	Свежий препарат в Hypothermosol Один инфузионный мешок Ограниченная стабильность при транспортировке	Криоконсервированный препарат в PlasmaLyte-A+1% ЧСА и CS10, хранящийся в LN2 Множество аликвот Более длительная стабильность при транспортировке	Гибкие условия транспортировки Гибкое расписание для пациента Более своевременное тестирование выпускаемого препарата
Общее расчетное время процесса	43-55 дней от этапа A до этапа E	22 дня от этапа A до этапа E	Более короткие сроки лечения для пациента Сокращение сроков занятости чистых помещений Снижение стоимости препарата

4. Сокращения

мкг	микрограмм
мкл	микролитр
мкм	микрометр
АПК	антигенпредставляющие клетки
CD	кластер дифференцировки
CM	центральные клетки памяти
CM1, CM2	среда для культивирования клеток 1, 2
CO_2	диоксид углерода
CS10	среда для криоконсервирования CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)
Ct	пороговый цикл ПЦР
DAMP	молекулы ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов
dCt	разница между эталонным значением Ct и экспериментальным значением Ct
ddCt	разница между dCt и значением Ct 10-нг стандарта
ECAR	скорость закисления внеклеточной среды (мера гликолиза)
EM	эффекторные клетки памяти
ER+/PR+	эстрогеновый рецептор+/прогестероновый рецептор+

GMP	Надлежащая производственная практика
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хенкса
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин
IFN-γ	интерферон-гамма
IL	интерлейкин
ME	международные единицы
LN2	жидкий азот
мл	миллилитр
мм	миллиметр
Н/О	не определено
нг	нанограмм
°С	градусы Цельсия
OCR	скорость поглощения кислорода (мера окислительного фосфорилирования)
OKT3	обозначение клона анти-CD3 моноклонального антитела
МКПК	мононуклеарные клетки периферической крови
PD	разработка процесса
ПБР	протокол быстрого размножения
Rh	рекомбинантный человеческий
СОП	стандартная операционная процедура
T/S	отношение числа копий теломерных повторов к числу копий однокопийного гена
ОИЛ	опухоль-инфильтрирующий лимфоцит
VDJ	вариабельный, определяющий разнообразие и соединительный сегменты Т-клеточного рецептора
Vα, Vβ	сегменты вариабельной области зрелого Т-клеточного рецептора в преобладающих опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах
мкг	микрограмм
мкл	микролитр
мкм	микрометр
АПК	антигенпредставляющие клетки
CD	кластер дифференцировки
СМ	центральные клетки памяти
СМ1, СМ2	среда для культивирования клеток 1, 2
CO_2	диоксид углерода

CS10	среда для криоконсервирования CryoStor® CS10 (BioLife Solutions)
Ct	пороговый цикл ПЦР
DAMP	молекулы ассоциированных с повреждением молекулярных паттернов
dCt	разница между эталонным значением Ct и экспериментальным значением Ct
ddCt	разница между dCt и значением Ct 10-нг стандарта
ECAR	скорость закисления внеклеточной среды (мера гликолиза)
EM	эффекторные клетки памяти
ER+/PR+	эстрогеновый рецептор+/прогестероновый рецептор+
GMP	Надлежащая производственная практика
HBSS	сбалансированный солевой раствор Хенкса
ЧСА	человеческий сывороточный альбумин
IFN-γ	интерферон-гамма
IL	интерлейкин
ME	международные единицы
LN2	жидкий азот
мл	миллилитр
мм	миллиметр
Н/О	не определено
нг	нанограмм
°C	градусы Цельсия
OCR	скорость поглощения кислорода (мера окислительного фосфорилирования)
OKT3	обозначение клона анти-CD3 моноклонального антитела
МКПК	мононуклеарные клетки периферической крови
PD	разработка процесса
ПБР	протокол быстрого размножения
Rh	рекомбинантный человеческий
СОП	стандартная операционная процедура
T/S	отношение числа копий теломерных повторов к числу копий однокопийного гена
ОИЛ	опухоль-инфильтрирующий лимфоцит
VDJ	вариабельный, определяющий разнообразие и соединительный сегменты Т-клеточного рецептора

Vα, Vβ	сегменты вариабельной области зрелого Т-клеточного рецептора в преобладающих опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах

5. Дизайн эксперимента

5.1 **Способ 2А**

5.1.1 **Пре-ПБР**: после получения опухоль переносят в бокс биологической безопасности (класс II, тип А2). В стерильных условиях опухоль извлекают из транспортного контейнера и промывают в HBSS, содержащем 50 мкг/мл гентамицина. Лаборант измельчает опухоль на 40 фрагментов размером 3X3X3 мм, которые переносят во флакон G-REX 100M, содержащий предварительно нагретую среду CM1, содержащую 6000 МЕ/мл rhIL-2. Флакон помещают в инкубатор с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2 на 11 дней. Если из опухоли получено более 40 фрагментов, можно использовать более одного G-REX 100M. Затем собирают клетки и готовят для ПБР.

5.1.2 **ПБР**: В день 11 готовят один флакон G-REX 500M, содержащий 5 л CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл rhIL-2, 30 нг/мл анти-CD3 (клон OKT3) и $5x10^9$ облученных аллогенных питающих клеток МКПК. ОИЛ собирают из флакона G-REX 100M пре-ПБР после уменьшения объема среды, подсчитывают и высевают во флакон G-REX 500M при плотности в диапазоне от $5x10^6$ до $200x10^6$ клеток. Затем флакон помещают в инкубатор для культивирования тканей с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2 на пять дней. В день 16 уменьшают объем среды во флаконе G-REX 500M, ОИЛ подсчитывают и определяют их жизнеспособность. В это время ОИЛ переносят в несколько флаконов G-REX 500M (максимум шесть флаконов), с плотностью засевания $1x10^9$ ОИЛ/флакон. Затем все флаконы помещают в инкубатор для культивирования тканей с температурой 37°C и увлажненной атмосферой с 5% CO_2 еще на шесть дней. В день 22, день сбора клеток, объем среды в каждом флаконе уменьшают на 90%, клетки объединяют и фильтруют через 170-мкм фильтр для крови, а затем собирают в 3-л мешок Origin EV3000, или эквивалентный мешок, в процессе подготовки к автоматизированному промыванию с использованием LOVO.

5.1.3 **Сбор клеток и окончательное формулирование:** ОИЛ промывают, используя автоматизированную систему обработки клеток LOVO, которая заменяет 99,99% среды для культивирования клеток промывающим буфером, состоящим из PlasmaLyte-A с добавлением 1% ЧСА. LOVO действует на основе технологии вращающейся фильтровальной мембраны, которая позволяет извлекать свыше 92% ОИЛ, при этом практически исключая остаточные компоненты среды для культивирования ткани, в том числе сыворотку, факторы роста и цитокины, а также другой детрит и частицы. После завершения промывания проводят подсчет клеток для оценки размножения ОИЛ и их жизнеспособности при сборе клеток. CS10 добавляют к промытым ОИЛ в соотношении 1:1 по объему, получая конечный препарат способа 2А. Конечный сформулированный препарат разделяют на аликвоты в мешки для криогенного хранения, герметично закрывают и помещают в предварительно охлажденные алюминиевые кассеты. Мешки для криогенного хранения, содержащие ОИЛ, затем

замораживают, используя морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки CryoMed (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) в соответствии с СОП LAB-018 Rev 000 «Работа с морозильной камерой с регулируемой скоростью заморозки».

5.2 **Образцы ОИЛ**: собирали четыре вида ОИЛ для проведения сравнения характеристик.

5.2.1 Свежесобранные ОИЛ (непосредственно из промывающего буфера PlasmaLyte-A с 1% ЧСА)

Размороженные ОИЛ (размороженные непосредственно из мешка с конечным препаратом)

5.2.2 Свежие ре-ПБР ОИЛ с расширенным фенотипом (свежесобранные ОИЛ, культивируемые в течение 7-14 дней с IL-2, питающими клетками МКПК и анти-CD3 клона OKT3)

5.2.3 Размороженные ОИЛ с расширенным фенотипом (размороженные ОИЛ, культивируемые в течение 7-14 дней с IL-2, питающими клетками МКПК и анти-CD3 клона OKT3)

5.3 **Краткое описание тестирования** (смотри Фигуру 2)

5.3.1 Тестирование пре-ПБР включает оценку количества IL-2 и анализ метаболитов в клеточной культуре, таких как глюкоза, молочная кислота, L-глутамин и аммиак, в течение пре-ПБР.

5.3.1.1 Количественное определение IL-2: среду периодически отбирают из пре-ПБР культуры и тестируют методом ELISA для количественного определения IL-2. Ссылка на: инструкции производителя для набора R&D Systems Human IL-2 Quantikine ELISA.

5.3.1.2 Анализ метаболитов в клеточной культуре: среду периодически отбирают из пре-ПБР культуры и тестируют на следующие метаболиты: глюкоза, молочная кислота, L-глутамин и аммиак. Ссылка на: руководство пользователя для Roche Cedex Bioanalyzer.

5.3.2 Тестирование ПБР включает расширенный набор анализов, таких как определение количества клеток, % жизнеспособности, проточно-цитометрический анализ клеточных поверхностных молекул, анализ активности (продуцирование IFN-γ), биолюминесцентный анализ перенаправленного лизиса, анализ продуцирования гранзима B, анализ клеточного метаболизма и определение длины теломер.

5.3.2.1 **Определение количества и жизнеспособности клеток**: в образцах ОИЛ проводят подсчет и определение жизнеспособности клеток, используя автоматический счетчик клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) в соответствии с СОП LAB-003 Rev 000 «Цитометр с визуализацией, автоматический счетчик клеток Cellometer K2».

5.3.2.2 **Анализ методом проточной цитометрии биомаркеров клеточной поверхности**: образцы ОИЛ разделяют на аликвоты для анализа поверхностных маркеров методом проточной цитометрии, используя процедуру, описанную в WRK LAB-041 Rev 000 «Окрашивание поверхностных антигенов пост-ПБР ОИЛ».

5.3.2.3 **Анализ активности (продуцирование IFN-γ)**: Другой показатель цитотоксического потенциала измеряют 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 определяют, используя WRK LAB-016 Rev 000 «Стимуляция ОИЛ для измерения секреции IFN-γ».

5.3.2.4 **Биолюминесцентный анализ перенаправленного лизиса:** Цитотоксический потенциал ОИЛ для лизиса клеток-мишеней оценивают, используя анализ с совместным культивированием ОИЛ и биолюминесцентной линии клеток, P815 (клон G6), в соответствии с СОП, кратко изложенным в WRK LAB-040 «Биолюминесцентный анализ перенаправленного лизиса (анализ активности) для ОИЛ».

5.3.2.5 **Продуцирование гранзима B:** гранзим B представляет собой другой показатель способности ОИЛ уничтожать клетки-мишени. Супернатанты среды после рестимуляции, как описано в 5.2.5.3, также оценивают на уровни гранзима B, используя набор Human Granzyme B DuoSet ELISA Kit (R & D Systems, Minneapolis, MN) в соответствии с инструкциями производителя.

5.3.2.6 **Клеточный (дыхательный) метаболизм:** клетки обрабатывают ингибиторами митохондриального дыхания и гликолиза для определения метаболического профиля ОИЛ, состоящего из следующих показателей: базального окислительного фосфорилирования (измеренного на основании OCR), запасной дыхательной емкости, базальной гликолитической активности (измеренной на основании ECAR) и гликолитического резерва. Метаболические профили определяют, используя процедуру, кратко описанную в WRK LAB-029 «Seahorse комбинированный анализ для определения митохондриального/гликолитического стресса».

5.3.2.7 **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). Используют два распространенных метода измерения длины теломер, а именно, флуоресценцию при in situ гибридизации (FISH; Agilent Technologies, Santa Clara, CA) и количественную ПЦР.

5.3.3 Дополнительные образцы были собраны для следующих тестов, и могут быть проанализированы в будущем, при необходимости:

5.3.3.1 Подробный анализ цитокинов

5.3.3.2 Секвенирование TCR

6. Достигнутые результаты

Проводили всего 9 экспериментов с использованием ОИЛ, полученных из опухолей, описанных в разделе 2.3 дизайна эксперимента, и условий сбора клеток, описанных в разделе 5.1. ОИЛ, собранные с использованием способа 2A, подвергали тестированию, кратко описанному в разделе 5.3.2, для выяснения их способности к размножению, их жизнеспособности, фенотипа, цитотоксического потенциала и

метаболического профиля. Все анализы были проведены для свежесобранного препарата ОИЛ и размороженного замороженного препарата ОИЛ (способ 2А).

6.1 **Определение количества и жизнеспособности клеток**

6.1.1 Количество клеток определяли в конце фазы пре-ПБР, в день 5 или 6 ПБР (день размножения) и в конце фазы ПБР, как до промывания LOVO, так и после промывания LOVO. Измеренное количество клеток затем использовали для анализа размножения ОИЛ в процессе ПБР и извлечения ОИЛ после промывания LOVO. После размораживания клетки вновь подсчитывали для определения извлечения после размораживания (на основании концентрации, при которой ОИЛ были заморожены) и жизнеспособности после размораживания перед проведением других аналитических тестов. В Таблице 3 приведены все результаты для девяти экспериментов с использованием способа 2А.

Таблица 32: Количество клеток, % жизнеспособности и размножение ОИЛ после экспериментов с использованием способа 2А

	M1061 T	**M1062 T**	**M1063 T**	**M1064 T**	**M1065 T**	**EP11001 T**	**M1056 T**	**M1058 T**	**M1023 T**
пре-ПБР инокулят	$3,3x10^7$	$1x10^8$	$7,5x10^7$	$1,8x10^8$	$4,1x10^6$	$5,4x10^6$	$7x10^7$	$4,7x10^7$	$4,8x10^7$
День 5/6, количество	$1,3x10^9$	$4x10^9$	$3x10^9$	$3,6x10^9$	$6,6x10^8$	$2,8x10^9$	$4,0x10^9$	$3,7x10^9$	$2,2x10^9$
Кратность размножения со дня 0 до дня 11	898	590	470	130	1900	522	771	1400	850
Сбор клеток	$2,8x10^{10}$	$5,6x10^{10}$	$3,5x10^{10}$	$2,3x10^{10}$	$7,8x10^9$	$2,63x10^{10}$	$5x10^{10}$	$6,7x10^{10}$	$4,1x10^{10}$
LOVO, извлечение (%)	100	68	100	100	92	95	100	90	99
Криомешки для хранения	3x30 мл	2x100 мл	2x100 мл	2x50 мл	3x100 мл	2x65 мл	2x100 мл	2x100 мл	2x100 мл
Извлечение после размораживания (%)	103	84	90	88	101	82	82	86	78
Жизнеспособность после размораживания (%)	84,75	84,36	77,15	83,48	79,98	74,85	80,28	85,03	89,21

6.1.2 Для способа 2A в СОП определено исходное количество ОИЛ для ПБР в диапазоне 5-200x10^6 ОИЛ. Диапазон для девяти образцов ОИЛ, использованных для инициации ПБР в способе 2A, составлял 4,1x10^6 (M1065T) - 1,8x10^8 (M1064T), со средним исходным количеством ОИЛ, составляющим 6,58x10^7. Интересно, что в случае ПБР, в которых высевали меньшее количество ОИЛ, наблюдали большую степень увеличения количества клеток при сборе клеток ПБР (диапазон кратности увеличения количества для всех 9 ПБР: 130-1900 раз; среднее увеличение количества 840 раз). Среднее количество ОИЛ, собранных после завершения этих девяти ПБР в способе 2A, составляло 4,49x10^{10} (диапазон 7,8x10^9-6,7x10^{10}).

6.1.3 Для сравнительной статистики способа 1C смотри раздел «Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC)» заявки на регистрацию нового экспериментального лекарственного средства (IND) для LN144/LN-145.

6.1.4 В способе 1C используют манипуляции вручную и центрифугирование для промывания препарата ОИЛ. Это отнимает много времени, но что еще более важно, может приводить к потере до 25% препарата на этапе между сбором клеток и окончательным формулированием. Автоматизированное промывание клеток в системе LOVO дает возможность минимизировать потерю клеток и, кроме того, промывание в закрытой системе уменьшает риск загрязнения препарата на этапах промывания. Извлечение препарата после этапа промывания LOVO в протоколе в среднем составляло 93,8 ± 10,4% извлечения препарата ОИЛ, введенного на этап промывания. Эта статистика включает показатели для препарата ОИЛ M1062T, извлечение которого после промывания LOVO составляло 68%, при этом ошибка оператора при проведении LOVO привела к необходимости центрифугирования образца, а затем повторного проведения процедуры LOVO (смотри раздел 7, «Отклонения и несоответствия»). Это представляет собой очень полезное усовершенствование относительно этапа промывания в способе 1C в день сбора клеток ПБР.

6.1.5 Извлечение ОИЛ после размораживания также является важной проблемой для замороженных препаратов ОИЛ. Извлечение препарата определяют путем измерения количества клеток, извлеченных из мешка после размораживания, в сравнении с количеством клеток, помещенных в каждый мешок для замораживания перед криоконсервированием. Диапазон извлечения после размораживания составлял 78-103%, со средним показателем извлечения 88,2 ± 8,6%.

6.1.6 Хотя имеет место значительная разница в жизнеспособности образцов до и после замораживания, в среднем, наблюдали лишь 2% потерю жизнеспособности после размораживания. Жизнеспособность ОИЛ, переданных на этап криоконсервирования, составляла 84,3 ± 4,7%, и те же ОИЛ после размораживания имели жизнеспособность 82,1 ± 4,4% (p=0,0742, парный критерий Стьюдента, непараметрический). Согласно критериям для выпуска препарата в случае свежего клинического препарата ОИЛ, полученного способом 1C, необходима жизнеспособность минимум 70%. Невзирая на небольшую потерю жизнеспособности при размораживании, для всех 9 экспериментов, проведенных

способом 2А, препараты соответствовали этому критерию выпуска после размораживания криогенного препарата. В Таблице 4 и на Фигуре 3 показана жизнеспособность ОИЛ, переданных на этап криоконсервирования (свежие+CS10), и жизнеспособность ОИЛ после размораживания.

Таблица 33: Сравнение жизнеспособности свежего и размороженного препаратов.

	M1061T	**M1062T**	**M1063T**	**M1064T**	**M1065T**	**EP11001T**	**M1056T**	**M1058T**	**M1023T**
Свежие+CS10	88,05	84,45	82,05	86,75	76,35	77,9	84,8	87,5	90,5
Размороженные	84,75	84,36	77,15	83,48	79,98	74,85	80,28	85,03	89,21

6.2 **Ре-ПБР размножение ОИЛ**. В дополнение к изучению способности свежего препарата размножаться в ПБР, оценивали способность как свежего, так и размороженного, препаратов ОИЛ размножаться при рестимуляции свежими облученными аллогенными МКПК, в качестве питающих АПК, и свежими анти-CD3. Через 7 дней эти препараты рестимулированных ОИЛ анализировали на их способность размножаться в сравнении с исходными условиями культивирования. На Фигуре 4 и в Таблице 5 показано среднее увеличение количества клеток ре-ПБР ОИЛ после 7 дней роста в культуре. Анализ данных с использованием парного критерия Стьюдента показал, что способность ОИЛ размножаться в ре-ПБР существенно не различается от того, начинают ли ПБР с препаратом свежих ОИЛ или размороженных ОИЛ ($p=0,81$).

Таблица 34: Сравнение свежих и размороженных ОИЛ, размножающихся в ре-ПБР культуре

	MM1061T	**MM1062T**	**MM1063T**	**MM1064T**	**MM1065T**	**EEP11001T**	**MM1056T**	**MM1058T**	**MM1023T**
Свежие	139,67	264	227	60,12	24,67	268,83	176	316,33	202,33
Разморож.	177,33	110,33	220,67	177,6	220,2	302,5	114,77	190,67	73,82

6.3 **Метаболиты клеточной культуры**. Одной из основных идей способа 2А являлось то, что меньшее время на процесс и меньшее количество этапов процесса приведет к экономии средств и ограничит вариабельность. Возможными неблагоприятными последствиями этого может являться увеличение уровня нежелательных метаболитов и уменьшение источника питательных веществ. Как показано на Фигуре 5, нормальные показатели в крови электролитов (натрий и калий), питательных веществ (глутамин и глюкоза) и метаболитов (молочная кислота и аммиак) предоставляют

диапазон для рассмотрения при оценке результатов, полученных в день 11 пре-ПБР. Как показано на Фигуре 6, три препарата ОИЛ (M1061T, M1062T и M1064T) оценивали последовательно. В данных условиях содержание калия и натрия оставалось на нормальных уровнях, уровень глюкозы составлял >1,0 г/л и глутамина >0,3 ммоль/л, что было гораздо выше нижней границы нормальных значений для крови. Как и ожидалось, уровень лактата вырос до 0,8 г/л, примерно в 5 раз выше нормального уровня в крови, и уровень аммиака вырос до 3 ммоль/л, что является ожидаемым для быстро размножающихся клеток, и также существенно выше, что нормальные уровни в крови.

6.4 **Количественное определение IL-2**

6.4.1 Основным определяющим фактором пролиферации ОИЛ в пре-ПБР, помимо добавления глюкозы, глутамина и достаточного снабжения кислородом, является обеспечение высоких уровней rhIL-2. После его добавления к содержащей сыворотку среде, содержание IL-2 было измерено на уровне 2-3,5x10^3 МЕ/мл, и оно снижалось лишь до примерно 1,0x10^3 МЕ/мл за 11 дней культивирования. Это значительно превышает уровень 30-100 МЕ/мл, необходимый для поддержания пролиферации Т-клеток. Оценку концентраций IL-2 с использованием разных источников IL-2 (Prometheus, Akron, Cellgenix) в настоящее время проводят в отдельных экспериментах (QP-17-010: Qualification IL-2 from Cellgenix, Akron и Prometheus) в компании Lion Biotechnologies, Tampa.

6.5 **Продуцирование IFN-γ**

6.5.1 После 24-ч стимулирования ОИЛ магнитными гранулами Dynabeads с антителами к CD3, CD28 и 4-1BB, как описано в разделе 5.3.5.3, супернатант культур клеток собирали и анализировали на IFN-γ с использованием наборов для ELISA. Все рестимулированые ОИЛ продуцировали больше IFN-γ, чем их не стимулированных аналоги, свидетельствуя о том, что стимуляция ОИЛ приводит к их активации. На Фигуре 8 показана способность четырех разных протестированных композиций ОИЛ (свежих, размороженных, свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР ОИЛ) к секреции IFN-γ в окружающую среду при рестимуляции.

В Таблицах 6 и 7 приведены средние значения секреции IFN-γ в 9 экспериментах, проведенных способом 2A. Секреция IFN-γ в окружающую среду при рестимуляции не различается у препаратов свежих ОИЛ и размороженных криоконсервированных ОИЛ. В Таблице 6 показано, что свежий препарат продуцировал в среднем 4143 ± 2285 пг IFN-γ/10^6 ОИЛ, при этом размороженный препарат продуцировал 3910 ± 1487 пг IFN-γ/10^6 ОИЛ (p=0,55 с использованием парного критерия Стьюдента). При нормировании на суммарный препарат ОИЛ (Таблица 7), в среднем, при стимуляции свежих ОИЛ было продуцировано 86 ± 61 грамм IFN-γ, при этом размороженные стимулированные ОИЛ продуцировали 68 ± 40 грамм IFN-γ (p=0,13). Эти результаты показывают, что как свежие, так и размороженные, препараты ОИЛ продуцируют IFN-γ, и что отсутствует различие в способности свежих или соответствующих размороженных ОИЛ к продуцированию IFN-γ при стимуляции анти-CD3/анти-CD28/анти-4-1BB.

Таблица 35: Секреция IFN-γ свежими и размороженными ОИЛ (выражено в виде пг/10^6 клеток/24 часа)

	M106 1T	M106 2T	M106 3T	M106 4T	M106 5T	EP1100 1T	M10 56T	M105 8T	M10 23T
Свежие	4570	3921	5589	619	1363	4263	6065	2983	7918
Разморож.	3158	3543	5478	1563	2127	5059	4216	4033	6010
Свежие ре-ПБР	3638	1732	971	2676	2753	1461	2374	770	3512
Разморож. ре-ПБР	2970	2060	1273	1074	1744	2522	5042	4038	923

Таблица 36: Секреция IFN-γ свежими и размороженными ОИЛ. Все значения в 1012 (выражено в виде грамм/10^6 клеток/24 часа)

	M106 1T	M106 2T	M106 3T	M106 4T	M106 5T	EP110 01T	M105 6T	M105 8T	M102 3T
Свежие	67,1	78,4	99,6	8,4	4,8	66,1	157,0	109,0	187,0
Разморож.	47,7	59,7	87,9	18,7	7,5	64,4	88,9	127,0	111,0

6.6 **Продуцирование гранзима B**

6.6.1 ОИЛ стимулировали магнитными гранулами Dynabeads с антителами к CD3, CD28 и 4-1BB в течение 24 час, как описано в 5.2.5.3, супернатант от культур клеток собирали через 24 ч и анализировали уровни гранзима B методом ELISA. Все рестимулированные ОИЛ продуцировали больше гранзима B, чем их не стимулированные аналоги, свидетельствуя о том, что стимуляция ОИЛ приводит к их активации. На Фигуре 9 показана способность свежих ОИЛ, свежих ре-ПБР ОИЛ и размороженных ре-ПБР ОИЛ к секреции гранзима B в окружающую среду при рестимуляции коктейлем цитокинов.

[00868] Все препараты демонстрировали секрецию гранзима B в диапазоне уровней от 9190 пг/10^6 жизнеспособных клеток до 262000 пг/10^6 жизнеспособных клеток (Таблица 8). В Таблице 6 показано, что свежий препарат продуцировал в среднем 60644+42959, при этом свежие и размороженные ре-ПБР клетки продуцировали 93600+67558 и 103878+84515, соответственно. Сравнение свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР препаратов показало, что отсутствовала разница в активности ОИЛ, полученных в любых условиях (p=0,7). Из-за отсутствия измерения гранзима B в размороженном препарате не проводили статистический анализ для свежего препарата ОИЛ.

Таблица 37: Секреция гранзима B в свежих ОИЛ, свежих ре-ПБР ОИЛ и размороженных ре-ПБР ОИЛ (выражено в виде пг/10^6 клеток/24 часа)

	M106 1T	M106 2T	M106 3T	M106 4T	M106 5T	EP1100 1T	M105 6T	M105 8T	M102 3T
Свежие	10600	10800	49100	28400	24300	17900	12000	12900	79100

		0					0		
Свежие ре-ПБР	216000	37700	42400	91800	192000	22200	97300	73800	69200
Разморож. ре-ПБР	262000	113000	35100	65600	48700	9190	147000	201000	53300

6.7 **Анализ методом проточной цитометрии биомаркеров клеточной поверхности**

[00869] Фенотипическое профилирование ОИЛ: Четыре панели антител были стандартизированы в LION для подробной характеризации функционального профиля Т-клеток. Эти панели использовали для иммунофенотипирования свежих ОИЛ, размороженных ОИЛ, свежих ре-ПБР ОИЛ и размороженных ре-ПБР ОИЛ. Все данные, использованные для графического представления в данном разделе, также представлены в формате таблиц (Таблицы 14-24) в прилагаемом разделе 10.

6.8 **Биолюминесцентный анализ перенаправленного лизиса**

6.8.1 Для определения потенциальной способности полученных способом 2А ОИЛ к уничтожению их мишеней – опухолевых клеток, авторы изобретения разработали анализ активности, включающий совместное культивирование ОИЛ с биолюминесцентной суррогатной линией P815 клеток-мишеней, как описано в разделе 5.3.2.4. 4-часовое совместное культивирование разных композиций ОИЛ с P815 в присутствии стимулирующих анти-CD3 позволяет определять цитотоксический потенциал клеток ОИЛ в виде LU_{50}, литических единиц, которые можно определять, как число ОИЛ, необходимое для уничтожения 50% клеток-мишеней. Этот показатель затем выражали в виде $LU_{50}/10^6$ ОИЛ. На Фигуре 32 представлен цитотоксический потенциал ОИЛ из свежего препарата, а также двух вариантов ре-ПБР ОИЛ, свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР клеток.

6.8.2 Сравнение свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР клеток показывает, что отсутствует существенная разница в способности всех этих ОИЛ уничтожать клетки-мишени ($p=0,3126$). Эти данные подтверждают вывод о том, что отсутствует различие между свежим и размороженным препаратами в отношении цитотоксического потенциала препарата ОИЛ. Не проводили сравнение со свежими препаратами, поскольку цитотоксический потенциал не измеряли непосредственно после размораживания ОИЛ. В Таблице 9 приведены литические единицы ОИЛ, необходимые для уничтожения 50% клеток-мишеней линии P815.

Таблица 38: Литические единицы ОИЛ в отношении клеток-мишеней линии P815

	Свежие	**Свежие ре-ПБР**	**Размороженные ре-ПБР**
M1061T	21,7	42,3	342

M1062T	5,9	17,0	20,9
M1063T	14,2	161	12,5
M10641	22,2	8,7	4,4
M10651	42,6	411	128_8
EP11001T	1,8	4,3	147
M1056T	25,0	16,6	18,2
M10513T	76,9	13,8	16,6
M1023T	30,8	25,6	30,4
Среднее ± SD	26,8 ± 22,5	20,6 ± 13,3	31,1 ± 37,6

6.9 **Клеточный метаболический профиль ОИЛ**

6.9.1 Для оценки метаболического здоровья пост-ПБР ОИЛ авторы изобретения использовали инструменты анализа метаболизма Seahorse (XFp и XFe96) от компании Agilent Technologies (Santa Clara, CA), следуя протоколу, изложенному в разделе 5.3.2.6. Вкратце, за счет обработки клеток ингибиторами, направленными на конкретные аспекты или окислительного фосфорилирования, или гликолиза, клетки подвергают стрессу таким образом, который позволяет определять их SRC и гликолитический резерв. Кроме того, можно определять базальные уровни как окислительного фосфорилирования (базальную OCR), так и гликолиза (базальную ECAR). И наконец, поскольку эти ингибиторы окислительного фосфорилирования и гликолиза объединяют в одном тесте, может быть обнаружен потенциальный скрытый резерв SRC, который проявляется только тогда, когда клетки обрабатывают конкурентным ингибитором гликолиза, 2-дезоксиглюкозой (2-DG), (обозначение SRC2DG), что приводит к увеличению SRC, которое в противном случае остается скрытым. Эту дополнительную дыхательную емкость называют «скрытой» SRC. В Таблице 9 представлены метаболические профили свежесобранных ОИЛ, свежих ре-ПБР ОИЛ и размороженных ре-ПБР ОИЛ, полученные в анализе метаболического стресса, выполненном на клетках.

6.9.2 На Фигурах 55A - F представлены данные из Таблицы 38 в графической форме. Препарат свежесобранных ПБР имеет некоторые статистически значимые различия с препаратами свежих ре-ПБР и размороженных ре-ПБР ОИЛ. Это не удивительно, поскольку препарат ре-ПБР был рестимулирован свежими облученными МКПК в качестве АПК и свежим анти-CD3 антителом либо сразу после ПБР, либо после размораживания. Однако во всех случаях отсутствовала существенная разница между свежими и размороженными препаратами при их рестимуляции в процедуре ре-ПБР (смотри p-значения в Таблице 9). Это показывает, что способ криоконсервирования не оказывает отрицательного воздействия на препарат ОИЛ. В частности, в анализе окислительного фосфорилирования препараты ре-ПБР ОИЛ имели более высокие показатели SRC, чем соответствующие им свежесобранные препараты ПБР. В анализе гликолиза ре-ПБР ОИЛ имели статистически достоверно более высокие базальные уровни

гликолиза, и наоборот, статистически достоверно более низкие уровни гликолитического резерва, чем свежий препарат ПБР. Следует отметить, что это может указывать на то, что ре-ПБР ОИЛ являются в более высокой степени активированными, чем свежесобранные ОИЛ, поскольку известно, что активированные здоровые ОИЛ проявляют более высокие уровни гликолитической активности (Buck et al., JEM 212:1345-1360; 2015).

Таблица 39: Метаболический профиль ОИЛ, полученных способом 2А

Базальная OCR, пмоль/мин	**M1061**	**M1062**	**M1063**	**Moff2**	**Moff3**	**Moff4**	**EP11001T**	**M1064**	**M1065**	**Средн.**	**SD**	**р относ. свежих**	**р относ. свежих ре-ПБР**
PLLA	50,33	33,95	74,89	36,80	38,48	39,89	63,02		55,89	49,16	14,56		
Свежие ре-ПБР	38,92	38,48	54,35	25,98	18,68	38,61	37,33	41,04		36,67	10,57	0,03	
Размор. ре-ПБР	39,25	43,28	60,05	30,68	57,90	59,08	27,85	52,58	32,82	44,83	12,90	0,48	0,11
Явная SRC, пмоль/мин													
PLLA	24,74	10,45	101,18	47,32	77,00	35,07	31,39		3,02	41,27	33,22		
Свежие ре-ПБР	51,72	36,46	48,24	28,34	37,69	21,02	9,93	99,71		41,64	27,17	0,29	
Размор. ре-ПБР	47,38	40,40	121,86	26,04	37,32	86,47	58,45	89,59	56,45	62,66	30,75	0,16	0,12
SRC20G, пмоль/мин													
PLLA	14,01	5,72	35,98	29,97	74,62	24,42	31,39		20,70	29,60	20,67		
Свежие ре-ПБР	81,80	78,82	52,73	38,69	92,37	42,35	-12,81	137,15		63,89	44,45	0,08	
Размор. ре-ПБР	76,97	77,72	177,48	48,27	56,57	69,05	74,14	130,76	85,89	88,54	40,59	0,00	0,25
Скрытая SRC,													

пмоль/мин													
PLLA	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		17,68	2,21	6,25		
Свежие ре-ПБР	30,08	42,36	4,50	10,35	54,68	21,33	0,00	2,63		20,74	20,13	0,02	
Размор. ре-ПБР	29,59	37,32	55,62	22,23	19,25	0,00	15,68	41,16	29,44	27,81	16,10	0,01	0,52
Базальная ECAR, мрН/мин													
PLLA	53,44	27,55	136,33	48,72	89,80	62,29	108,38		72,07	74,82	35,20		
Свежие ре-ПБР	96,48	96,63	171,47	102,87	145,19	153,97	35,60	147,02		118,65	44,19	0,10	
Размор. ре-ПБР	143,35	173,93	193,39	149,19	169,21	73,17	98,64	96,37	90,55	131,98	43,15	0,01	0,38
Гликолитический резерв, мрН/мин													
PLLA	32,11	26,18	52,00	19,09	38,01	39,03	43,14		76,43	40,75	17,61		
Свежие ре-ПБР	24,06	8,75	18,17	-8,28	-5,89	10,31	35,34	20,80		12,91	14,85	0,003	
Размор. ре-ПБР	15,50	-18,94	13,56	-6,78	11,45	54,84	-21,37	-12,66	-5,47	3,35	23,75	0,01	0,47

6.9.3 Прямое сравнение свежих и замороженных препаратов с использованием процедуры ре-ПБР позволило авторам изобретения определить, что в препаратах как свежих, так и замороженных, ОИЛ идентичные условия стимуляции приводили к метаболическим профилям, которые статистически не отличались между собой. Как свежие ре-ПБР, так и размороженные ре-ПБР, ОИЛ имели сходные уровни базального дыхания (Фигура 60A, 36,7 ± 10,6 и 44,8 ± 12,9 пмоль/мин, соответственно; p=0,11), а также сходные показатели (явной) SRC (Фигура 60B, 41,6 ± 27,2 и 62,7 ± 30,8; p=0,12). При обработке этих ре-ПБР клеток 2-DG, конкурентным ингибитором глюкозы, что приводит к ингибированию гликолиза, авторы изобретения установили, что как свежие, так и размороженные, ре-ПБР ОИЛ демонстрируют дополнительную, «скрытую», запасную дыхательную емкость (SRC2DG; скрытая SRC), которая, в основном, является низкой, или отсутствует, в образце свежесобранных ОИЛ (Фигура 60C); только один

образец имел высокие уровни SRC2DG (Фигура 60C) в свежесобранных ОИЛ, и наоборот, лишь один из семи протестированных образцов демонстрировал отсутствие скрытой SRC при ре-ПБР. Скрытая SRC (Фигура 60D) в свежих ре-ПБР имела средние значения 20,7 ± 20,1, в то время как скрытая SRC (Фигура 60D) в размороженных ре-ПБР находилась в диапазоне 27,8 ± 16,1; p=0,52).

6.9.4 Наиболее поразительным метаболическим результатом для ОИЛ с расширенным фенотипом (ре-ПБР) являются постоянно высокие уровни базального гликолиза образцов с расширенным фенотипом (ре-ПБР). Базальный гликолиз (Фигура 60E) постоянно является высоким в ре-ПБР образцах, в среднем 118,7 ± 44,2 мрН/мин в свежих ре-ПБР и 132,0 ± 43,2 мрН/мин в размороженных ре-ПБР. Эти образцы статистически достоверно не отличаются друг от друга (p=0,38). Однако, как отмечено выше, свежесобранный образец не обладает такими высокими базальными уровнями гликолиза. В сравнении со свежими ре-ПБР ОИЛ, эта разница является существенной, но статистически не значимой (p=0,10); однако при сравнении с размороженными ре-ПБР образцами, разница является статистически значимой (p 0,01). Эти ре-ПБР клетки, по-видимому, в значительной степени зависят от гликолиза для удовлетворения своих энергетических потребностей, поскольку у них имеется очень небольшой гликолитический резерв при стрессе в метаболических анализах Seahorse (Фигура 60F): в свежих ре-ПБР ОИЛ в среднем 12,9 ± 14,9 мрН/мин; в размороженных ре-ПБР ОИЛ 3,35 ± 23,8 мрН/мин. Эти ре-ПБР образцы не отличаются друг от друга (p=0,47), однако оба статистически значимо отличаются в отношении гликолитического резерва от образцов свежесобранных ОИЛ, которые имеют средние значения 40,8 ± 17,6 мрН/мин (p=0,003 и 0,01 в сравнении со свежими ре-ПБР и размороженными ре-ПБР ОИЛ, соответственно). Дальнейшие исследования должны быть проведены для определения причины этих наблюдаемых различий в гликолизе между этими образцами свежесобранных и ре-ПБР ОИЛ.

6.10 **Измерение длины теломер**

6.10.1 Измерение длины теломер в пост-ПБР ОИЛ методами Flow Fish и кПЦР.

6.10.1.1 Flow-FISH анализ проводили с использованием набора Dako/Agilent Pathology Solutions (Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry) и следовали инструкциям производителя для измерения средней длины теломерных повторов. Линию 1301 клеток Т-клеточного лейкоза (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) использовали в качестве внутреннего эталонного стандарта в каждом анализе. Отдельные ОИЛ подсчитывали и смешивали с клетками 1301 в соотношении клеток 1:1. $2x10^6$ ОИЛ смешивали с $2x10^6$ клеток 1301. In situ гибридизацию проводили в растворе для гибридизации (70% формамид, 1% БСА, 20 мМ Tris, pH 7,0) в двух повторах, а также в присутствии и в отсутствие FITC-конъюгированного Telomere PNA зонда (FITC-00-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA), комплементарного последовательности теломерного повтора, в конечной концентрации 60 нМ. После добавления Telomere PNA зонда клетки инкубировали в течение 10 минут при 82°C в нагревательном блоке. Затем клетки помещали в темное место на ночь при

комнатной температуре. На следующее утро избыток теломерного зонда удаляли путем промывания промывающим раствором 2 раза по 10 минут в нагревательном блоке при 40°C. После промывания добавляли DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) до конечной концентрации 75 нг/мл. Окрашивание ДНК DAPI использовали для установки дискриминационного окна на клетки в G0/G1 популяции. Анализ образца проводили, используя проточный цитометр Yeti (Propel-Labs, Fort Collins, CO). Флуоресценцию теломер в тестируемом образце выражали в виде процента флуоресценции (fl) клеток 1301 в соответствии со следующей формулой: относительная длина теломер = [(средняя FITC fl тестируемых клеток с зондом - средняя FITC fl тестируемых клеток без зонда) × ДНК индекс клеток 1301 × 100] / [(средняя FITC fl клеток 1301 с зондом – средняя FITC fl клеток 1301 без зонда) × ДНК индекс тестируемых клеток.

6.10.1.2 кПЦР: метод кПЦР в реальном времени также использовали для измерения относительной длины теломер. Вкратце, отношение числа копий теломерных повторов к числу копий однокопийного гена (T/S) определяли с использованием термоциклера для ПЦР (Bio-Rad Laboratories, Inc.) в 96-луночном формате. Десять нанограмм геномной ДНК использовали в реакции ПЦР либо для теломер, либо для гемоглобина (hgb), и используемые праймеры были следующими: Tel-1b праймер (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), Tel-2b праймер (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), hgb1 праймер (GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC) и hgb2 праймер (CACCAACTTCATCCACGTTCACC). Все образцы анализировали в реакциях как для теломер, так и для и гемоглобина, и анализ выполняли в трех повторах на одном и том же планшете. В дополнение к тестируемым образцам каждый 96-луночный планшет содержал материал для построения стандартной кривой по пяти точкам от 0,08 нг до 250 нг, представляющий собой геномную ДНК, выделенную из клеток линии 1301. Отношение T/S (-dCt) для каждого образца рассчитывали путем вычитания среднего значения порогового цикла (Ct) гемоглобина из среднего значения Ct теломер. Относительное отношение T/S (-ddCt) определяли путем вычитания отношения T/S для точки 10,0 нг стандартной кривой из отношения T/S каждого неизвестного образца.

6.10.1.3 **Результаты и обсуждение измерения длины теломер**: Теломеры представляют собой кэпы (повторяющиеся нуклеотидные последовательности) на конце линейных хромосом, которые играют важную роль в обеспечении полной репликации хромосом. Измерение теломер является новым инструментом в изучении таких состояний, как дегенеративное заболевания, рак и старение. Предыдущие исследования в NIH (J Immunol. 2005, Nov 15;175(10):7046-52; Clin Cancer Res. 2011, Jul 1; 17(13): 4550–4557) показали, что увеличенная длина теломер ОИЛ связана с клиническим ответом. Напротив, группа Radvanyi не обнаружила существенную разницу в длине теломер ОИЛ у отвечающих и не отвечающих на лечение пациентов (Clin Cancer Res; 18(24); 6758–70). К настоящему времени, нет никаких доказательств того, что длина теломер связана с продолжительностью культивирования Т-клеток in vitro. Возможно, что пост-ПБР ОИЛ,

культивируемые способом 2A (22 дня культивирования), буду иметь большую длину теломер в сравнении с ОИЛ, культивируемыми способом 1C (25-36 дней культивирования).

7. Отклонения и несоответствия

7.1 Отклонения от протокола

7.1.1 M1061T: ПБР клетки были разделены в день 6 в 4 флакона G-Rex 500M.

7.1.2 M1062T: ПБР клетки были разделены в день 6 в 4 флакона G-Rex 500M. Из-за ошибки оператора, связанной с фильтрационной системой LOVO, во время процедуры произошла аварийная остановка, которая потребовала ручного сбора ОИЛ из одноразового набора. ОИЛ были успешно профильтрованы во время второго прогона LOVO.

7.1.3 M1063T: без отклонений M1064T: без отклонений

7.1.4 M1065T: пре-ПБР клетки количественно не соответствовали спецификации для подсчета клеток в день 11 ($<5x10^6$ клетки), однако были переведены в ПБР. В день 6 ПБР клетки были подсчитаны, помещены обратно в G-Rex 500M и подкормлены 4,5 л свежей среды. ОИЛ не были расфасованы в этот день из-за недостаточного количества клеток ($<1x10^9$ клеток в день 6 ПБР).

7.1.5 EP11001T: без отклонений

7.1.6 M1056T: пре-ПБР клетки культивировали в LION во флаконе G-REX 100 в течение вплоть до 21 дня. Опухолевые фрагменты были отфильтрованы в день 11 пре-ПБР, и ОИЛ были заморожены в день сбора клеток в 100% CS10 в количестве $30x10^6$ клеток на 1,5-мл флакон. Замороженные ОИЛ размораживали в Moffitt PD в среде CM1 с добавлением 6000 МЕ/мл rhIL-2 и оставляли покоиться на 3 дня перед началом дня 0 ПБР. В день 6 ПБР ОИЛ были расфасованы в 4 флакона, в которых они оставались до сбора клеток в день 11 ПБР.

7.1.7 M1058T: пре-ПБР клетки культивировали в LION во флаконе G-REX 100 в течение вплоть до 21 дня. Опухолевые фрагменты были отфильтрованы в день 11 пре-ПБР, и ОИЛ были заморожены в день сбора клеток в 100% CS10 в количестве $30x10^6$ клеток на 1,5-мл флакон. Замороженные ОИЛ размораживали в Moffitt PD в среде CM1 с добавлением 6000 МЕ/мл rhIL-2 и оставляли покоиться на 3 дня перед началом дня 0 ПБР. В день 6 ПБР ОИЛ были расфасованы в 4 флакона, в которых они оставались до сбора клеток в день 11 ПБР.

7.1.8 M1023T: пре-ПБР клетки культивировали в LION во флаконе G-REX 100 в течение вплоть до 21 дня. Опухолевые фрагменты были отфильтрованы в день 11 пре-ПБР, и ОИЛ были заморожены в день сбора клеток в 100% CS10 в количестве $30x10^6$ клеток на 1,5-мл флакон. Замороженные ОИЛ размораживали в Moffitt PD в среде CM1 с добавлением 6000 МЕ/мл rhIL-2 и оставляли покоиться на 3 дня перед началом дня 0 ПБР. В день 6 ПБР ОИЛ были расфасованы в 4 флакона, в которых они оставались до сбора клеток в день 11 ПБР.

7.2 Отклонения при тестировании

7.2.1 Подробный анализ цитокинов и секвенирование TCR не проводили.

8. Выводы и рекомендации

8.1 **Разработка более надежного способа.** Задача, стоящая перед Lion, заключалась в преобразовании предшествующего способа 1C Lion, который имел более длительное время обработки, в потенциально более коммерциализируемый способ 2A Lion, в котором используют модификации, приводящие к сокращению времени обработки, и криоконсервирование конечного препарата ОИЛ. С этой целью было проведено девять экспериментов для подтверждения того, что старый и новый способы демонстрируют сопоставимые выходы клеток и сопоставимые активность и фенотип ОИЛ. Особо следует отметить заметное упрощение всего процесса, что приводит к 50% сокращению общей продолжительности процессов пре-ПБР и ПБР, но при этом выходы ОИЛ являются сопоставимыми ($7,8x10^9$-$67x10^9$ клеток) в сравнении с ранее используемым способом 1C Lion, который в настоящее время практикует контрактная производственная организация. Недавнее обновление для презентации ASCO в июне 2017 года (среднее количество: $41,04x10^9$ клеток, с диапазоном 1,2-$96x10^9$ клеток). Кроме того, компания Lion успешно разработала криоконсервированный препарат ОИЛ, для которого характерно извлечение ОИЛ после размораживания, составляющее 78-103%, с >70% жизнеспособностью, что соответствует современным критериям выпуска препарата для способа 1C (смотри Таблицу 2).

8.2 **Анализ роли расширения фенотипа (ре-ПБР)**. Способность пролиферировать в ответ на митогенную стимуляцию (как в экспериментальных процессах ре-ПБР, описанных в настоящем отчете) является одним из важнейших атрибутов качества ОИЛ. Эксперименты, представленные в настоящем документе, показывают, что 8/9 препаратов размороженных ОИЛ были способны к >100-кратному увеличению количества за одну неделю, в сравнении с 7/9 соответствующих препаратов свежих ОИЛ, свидетельствуя в пользу сопоставимости препарата размороженных ОИЛ с препаратом свежих ОИЛ (Таблица 2). Двумя дополнительными важными атрибутами качества ОИЛ является их способность секретировать IFN-γ и/или гранзим B после стимуляции цитокинами (CD3/CD28/4-1BB). Стимуляция цитокинами как свежих, так и размороженных, препаратов приводит к секреции IFN-γ, превышающей 2 нг/10^6 клеток/24 часа в 7/9 свежих препаратах и во всех размороженных препаратах (Фигура 35) (смотри раздел 6.2 настоящего отчета). Секрецию гранзима B (Фигура 36) наблюдали во всех 9 экспериментах. Уровни CD4 и CD8 (Фигура 39 и Фигура 40) продемонстрировали замечательную внутреннюю согласованность между препаратами свежих и размороженных ОИЛ. Кроме того, анализ способности ОИЛ к уничтожению суррогатной мишени – опухолевой клеточной линии (P815, Фигура 59) показал, что как свежие, так и размороженные, ОИЛ обладали сходным цитотоксическим потенциалом.

8.3 **Метаболический стресс-тест ОИЛ продемонстрировал надежную биоэнергетику**. Анализ метаболических профилей препаратов свежих и размороженных ОИЛ, стимулированных в ре-ПБР, показал, что как свежие, так и размороженные, ОИЛ

отвечали аналогично в анализе метаболического стресса и не проявили никаких существенных различий в панели метаболических характеристик (Таблица 39). Таким образом, криоконсервированный препарат полученных способом 2A ОИЛ можно считать сопоставимым со свежим препаратом, полученным способом 1C, на основании четырех атрибутов качества: идентификационных характеристик, активности, количества и жизнеспособности клеток, которые описаны в настоящем документе. Сравнительный анализ соответствующих свежих и размороженных клеток показал, что они были вполне сопоставимыми в каждом анализе, описанном в настоящем документе.

8.4 **Критерии приемлемости**: Характерная гетерогенность препаратов ОИЛ с персонализированной терапией для каждого пациента отражает: (1) их уникальные ограничительные молекулы главного комплекса гистосовместимости (наиболее полиморфные генные продукты в организме человека); (2) уникальное вероятное развитие отдельных опухолей, возникающее из микросреды опухоли с геномной нестабильностью и уникальными индивидуальными драйверными мутациями и мутациями-пассажирами; и (3) гетерогенность, возникающую за счет аллельных вариаций, разнообразия N-области и VDJ перестановки в сегментах Vα и Vβ, определяющих Т-клеточные рецепторы, используемые для узнавания неоэпитопов общих антигенов опухоли и яичка, а также закодированных вирусами продуктов. Оценка дополнительных изменений, возникающих в результате изменений процесса, таким образом, является трудной задачей и требует оценки как можно большего числа параметров для гарантии максимально возможной «сопоставимости» изначально гетерогенного материала. Это было осуществлено путем тщательного изучения нескольких критериев приемлемости для осуществимости и сопоставимости, как подробно описано в Таблице 40, ниже.

Таблица 40: Критерии приемлемости для осуществимости и сопоставимости

Отбор образцов	**Параметр**	**Метод анализа**	**Критерии приемлемости для осуществимости**	**Критерии приемлемости для сопоставимости**
День 22	Общее число жизнеспособных клеток	Автоматический счетчик клеток с AOPI	$\geq 1{,}5 \times 10^9$ жизнеспособных клеток	Отсутствует статистически значимая разница между группами свежих и замороженных ре-ПБР (p-значение <0,05)
	% Жизнеспособности	Автоматический счетчик клеток с AOPI	≥70% жизнеспособных	Отсутствует статистически значимая разница между группами

				свежих и замороженных ре-ПБР (p-значение <0,05)
	Чистота	Проточная цитометрия	≥90% Т-клеток	Отсутствует статистически значимая разница между группами свежих и замороженных ре-ПБР (p-значение <0,05)
		Секвенирование TCR	Н/П	Н/П
	Активность	IFNγ (ELISA)	≥2х уровня фона и ≥400 пг/1х10^6 жизнеспособных клеток/24 часа	Отсутствует статистически значимая разница между группами свежих и замороженных ре-ПБР (p-значение <0,05)
		Гранзим B ELISA	≥2х уровня фона	Н/П
		Биолюминесцентный анализ перенаправленного лизиса	Н/П	Н/П
	Дыхание	Стресс-тест Seahorse	Н/П	Н/П

На основании критериев приемлемости, приведенных в Таблице 11, ОИЛ будут оценены в отношении того, соответствуют ли они этим критериям. Было установлено соответствие критериям в каждом эксперименте и для каждой линии ОИЛ (n=9). Для статистического анализа использовали критерий Стьюдента. Использовали непараметрический критерий Стьюдента для расчета p-значения для % жизнеспособности, поскольку показатели жизнеспособности не соответствуют гауссовому распределению. Смотри Таблицу 41, ниже.

Таблица 41: Соответствие критериям приемлемости для осуществимости

Линия ОИЛ	**Количество клеток**		**% Жизнеспособности**		**Чистота (проточная цитометрия)**		**Активность (IFNγ ELISA) пг/1х10^6 клеток/24 ч**	
	Свежие	**Размороз**	**Свежие**	**Разморож**	**Свежие**	**Размороз**	**Свежие**	**Размор**

		ж.		.		ж.		ож.
M1061T	$6,48x10^9$	$6,66x10^9$	88,05	84,93	95,3	91,5	4570	3158
M1062T	$6,76x10^9$	$5,70x10^9$	84,45	83,73	99,7	98,9	3921	3543
M1063T	$14,9x10^9$	$13,5x10^9$	82,05	77,15	98,7	99,6	5589	5478
M1064T	$8,06x10^9$	$7,08x10^9$	86,75	83,36	84,5	89,8	619	1563
M1065T	$3,06x10^9$	$3,10x10^9$	76,35	80,90	96,8	91,4	1363	2127
EP11001T	$14,9x10^9$	$12,2x10^9$	77,9	74,85	90,4	94,3	4263	5059
M1056T	$13,1x10^9$	$10,7x10^9$	84,8	80,20	94,2	94,1	6065	4216
M1058T	$23,4x10^9$	$20,1x10^9$	87,5	85,07	99	96,2	2983	4033
M1023T	$18,4x10^9$	$144x10^9$	90,5	89,52	96,5	98,8	7918	6010
P-значение	0,1132		0,0742		0,9855		0,5821	
Статистически значимо отличаются	Нет		Нет		Нет		Нет	

[00870] На основании критериев приемлемости, приведенных в Таблице 40, свежие и замороженные ре-ПБР ОИЛ оценивали в отношении того, соответствуют ли они этим критериям. (Жизнеспособность не указана, поскольку продолжительность ре-ПБР составляла 7 дней и остаточные облученные МКПК невозможно было отличить от ОИЛ.) Значения в скобках приведены для случаев несоответствия критериям. В отношении критерия чистоты при измерениях на основании экспрессии CD3+, 6/9 свежих препаратов ре-ПБР ОИЛ соответствовали строгим критериям >90% (M1061, M1065 и EP11001 не соответствовали) и 8/9 размороженных препаратов соответствовали критериям приемлемости даже после ре-ПБР. Низкое количество CD3+ ОИЛ в свежих ре-ПБР EP11001T может быть объяснено чрезвычайным снижением экспрессии Т-клеточного рецептора. Измерение количества CD3+ ОИЛ в качестве показателя чистоты не проводили для размороженных ре-ПБР ОИЛ M1023T. Для этой композиции ОИЛ чистоту оценивали на основании окрашивания TCRap и результат отмечен звездочкой (*). Для статистического анализа использовали критерий Стьюдента. Смотри Таблицу 42, ниже.

Таблица 42: Соответствие критериям приемлемости для сопоставимости

Линия ОИЛ	**Количество клеток**		**Чистота (проточная цитометрия)**		**Активность (IFNγ ELISA) пг/1x10^6 клеток/24 ч**	
	Свежие ре-ПБР	**Разморож. ре-ПБР**	**Свежие ре-ПБР**	**Разморож. ре-ПБР**	**Свежие ре-ПБР**	**Разморож. ре-ПБР**
M1061T	$1,40x10^6$	$1,77x10^6$	**(86,1)**	99,3	3638	2970
M1062T	$2,64x10^6$	$1,10x10^6$	99,3	97,1	1732	2060

M1063T	2,27x10^6	2,21x10^6	99,2	97,4	971	1273
M1064T	1,76x10^6	1,15x10^6	83,8	37,8	2676	1074
M1065T	3,16x10^6	1,91x10^6	**(78,1)**	**(75,8)**	2753	1744
EP11001T	2,02x10^6	0,738x10^6	**(18,2)**	85,4	1461	2522
M1056T	0,601x10^6	1,78x10^6	98,1	96,7	2374	5042
M1058T	0,740x10^6	2,20x10^6	98,4	99,2	770	4038
M1023T	2,69x10^6	3,03×10610^6	97	39,9*	3512	923
P-значение	0,6815		0,3369		0,7680	
Статистически значимо отличаются	Нет		Нет		Нет	

Библиография

Goff SL, Dudley ME, Citrin DE, Somerville RP, Wunderlich JR, Danforth DN, Zlott DA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Klebanoff CA, Hughes MS, Restifo NP, Langhan MM, Shelton TE, Lu L, Kwong ML, Ilyas S, Klemen ND, Payabyab EC, Morton KE, Toomey MA, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. J Clin Oncol. 2016 Jul 10;34(20):2389-97. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7220. Epub 2016 May 23. PubMed PMID: 27217459; PubMed Central PMCID: PMC4981979.

Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. Immunol Rev. 2014 Jan;257(1):56-71. doi:10.1111/imr.12132. Review. PubMed PMID: 24329789; PubMed Central PMCID: PMC3920180.

Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, Rosenberg SA. Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. J Immunother. 2012 Apr;35(3):283-92. d10.1097/CJI.0b013e31824e801f. PubMed PMID: 22421946; PubMed Central PMCID: PMC3315105.

Somerville RP, Devillier L, Parkhurst MR, Rosenberg SA, Dudley ME. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE® bioreactor. J Transl Med. 2012 Apr 4;10:69.

Donia M, Larsen SM, Met O, Svane IM. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating lymphocyte manufacturing with use of the Wave bioreactor. Cytotherapy. 2014 Aug;16(8):1117-20. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.004; PubMed PMID: 24831841.

Henning AL, Levitt DE, Vingren JL, McFarlin BK. Measurement of T-Cell Telomere Length Using Amplified-Signal FISH Staining and Flow Cytometry. Curr Protoc Cytom. 2017 Jan 5;79:7.47.1-7.47.10. doi: 10.1002/cpcy.11. PubMed PMID 28055115

Kelesidis T, Schmid I. Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content.

Curr Protoc Cytom. 2017 Jan 5;79:7.26.1-7.26.23. doi: 10.1002/cpcy.12. PubMed PMID: 28055113.

Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team.. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. Exp Gerontol. 2014 Mar;51:15-27. doi:10.1016/j.exger.2013.12.004. Epub 2013 Dec 21. Review. PubMed PMID: 24365661;PubMed Central PMCID: PMC4523138.

Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. Correlation between terminal restriction fragments and flow-FISH measures in samples over wide range telomere lengths. Cell Prolif. 2014 Feb;47(1):20-7. doi: 10.1111/cpr.12086. PubMed PMID: 24450811.

Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. Nat Biotechnol. 1998 Aug;16(8):743-7. PubMed PMID: 9702772.

Li Y, Liu S, Hernandez J, Vence L, Hwu P, Radvanyi L. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro. J Immunol. 2010 Jan 1;184(1):452-65. doi: 10.4049/jimmunol.0901101. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19949105.

Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. Curr Opin Immunol. 2009 Apr;21(2):233-40. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002. Epub 2009 Mar 21. Review. PubMed PMID: 19304471; PubMed Central PMCID: PMC3459355.

Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Hodes RJ. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. J Immunother. 2007 Jan;30(1):123-9. PubMed PMID:17198091; PubMed Central PMCID: PMC2151201.

Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. J Immunol. 2005 Nov 15;175(10):7046-52. PubMed PMID: 16272366; PubMed Central PMCID: PMC1351312.

Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Mar;18(3):175-186. doi:10.1038/nrm.2016.171. Epub 2017 Jan 18. Review. PubMed PMID: 28096526.

Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. Cell Rep. 2017 Jan 3;18(1):41-53. doi:

10.1016/j.celrep.2016.12.005. PubMed PMID: 28052260; PubMed Central PMCID: PMC5225662.

Cardenas ME, Bianchi A, de Lange T. A Xenopus egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. Genes Dev.1993 May;7(5):883-94. PubMed PMID: 7684008.

de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 12;91(8):2882-5. Review. PubMed PMID: 8159672; PubMed Central PMCID: PMC43476.

de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. Mol Cell Biol. 1990 Feb;10(2):518-27. PubMed PMID: 2300052; PubMed Central PMCID: PMC360828.

9. Дополнительные таблицы

Таблица 43 - Фигура 39: CD4+ клетки

Опухоль	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Свежие	4,85	34	10,5	41,7	64,9	64,7	4,15	12,3	8,38
Размороженные	5,68	33	11,3	49,5	61,7	62,6	3,46	17,9	7,6
Свежие ре-ПБР	8,1	23,5	19,2	39/	31,9	16,3	6,46	12,9	16,7
Размороженные Ре-ПБР	11	33	15,3	49,3	39,3	26,7	9,51	17,2	19,1

Таблица 44 - Фигура 40: CD8+ клетки

Опухоль	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
Свежие	45,6	54,7	85,8	38,2	28,6	22,3	93,2	84	88,8
Размороженные	50,8	55,7	76,7	37	22,8	19	92,9	76,6	84,3
Свежие ре-ПБР	63	48,3	72,4	37,9	47,8	5,87	90,3	74,5	74,4
Размороженные Ре-ПБР	66,3	46,7	47	21,6	19,1	9,23	82,8	63,7	64,3

Таблица 45 - Фигура 41: CD4+CD154+ клетки и Фигура 105: CD8+CD154+ клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	CD154+	78,6	н/о	н/о	н/о	93,3	62,1	94	76,2
CD8	CD154+	37,3	н/о	н/о	н/о	85,8	19,9	89,3	61,1

Т-	Марке	M1061	M1062	M1063	M1064

клетки	ры	Свежие Ре-ПБР	Размор. Ре-ПБР	Свежие Ре-ПБР	Размор. Ре-ПБР	Свежие Ре-ПБР	Размор. Ре-ПБР	Свежие Ре-ПБР	Размор. Ре-ПБР
CD4	CD154+	88,9	84	56	82,1	68,2	93,6	97	90,3
CD8	CD154+	35,6	49	12,5	19	59,1	77,88	0,025	90,1

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	CD154+	91	87,2	79,1	83,1	89,3	92	90,1	92,6	77,9	66,9
CD8	CD154+	17	20,3	40	36,9	23	27,6	40,5	52,1	17,9	13,7

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	CD154+	0	91,6	52,1	87,1	77	86,4	92,7	85,1	90,7	81,3
CD8	CD154+	0,00609	61,8	45,3	74,8	47,3	81,7	73,6	78,3	24,2	27,1

Таблица 46 - Фигура 43: CD4+CD69+ клетки и Фигура 17: CD8+CD69+ клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	CD69+	33,9	н/о	н/о	н/о	82,2	68,8	51,3	84,8
CD8	CD69+	22,4	н/о	н/о	н/о	83	78,3	67,8	78,6

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	CD69+	58,7	69,6	67,6	77,6	77,6	86,7	85,5	78,5

CD8	CD69+	80,9	80	62,7	73,2	87,6	87,9	92,2	88,3

T-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	CD69+	82,7	84,4	78,7	58,3	83,9	84,9	89,7	644,6	33,8	38,7
CD8	CD69+	78,9	72,3	69,5	54,5	80,3	86	68	77,8	41,3	48,8

T-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	CD69+	90,2	93,2	74,7	39,1	96,1	93,8	91,1	93,7	35,3	80,1
CD8	CD69+	91,3	90,5	87,6	52,9	95,4	94,2	93,1	93,6	71,1	88,1

Таблица 47 - Фигура 45: CD4+CD137+ клетки и Фигура 19 CD8+CD137+ клетки

T-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	CD137+	19,8	н/о	н/о	н/о	65,4	30,4	н/о	1,31
CD8	CD137+	19,8	н/о	н/о	н/о	65,4	30,4	н/о	1,31

T-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	CD137+	15,4	30,4	73	78,1	62,6	53,2	51,6	64,7
CD8	CD137+	28,8	43,1	39,3	35,3	84,4	85,7	71,1	81

T-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.

CD4	CD137+	524	7,26	7,78	5,4	4,28	3,65	6,89	4,6	4,28	9,67
CD8	CD137+	3,23	7,26	7,78	5,4	4,28	3,65	6,89	4,6	4,28	9,67

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	CD137+	31,1	24,6	65,1	47,8	221	18,6	61,6	56,9	49,8	50,8
CD8	CD137+	50,9	33,8	57,3	54,6	77,3	78,8	76,9	87	58	50,3

Таблица 48 - Фигура 47: CD4+CM клетки и Фигура 21 CD8+CM клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	CM	1,08	н/о	0,59	0,29	10,4	2,08	14,4	0,13
CD8	CM	0,37	н/о	0,9	0,17	3,2	0,66	73,2	0,13

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	CM	2,32	7,71	13,8	12,6	13,4	22,3	15,9	18,6
CD8	CM	1,85	9,38	6,48	14,2	15,7	25,7	24,2	25,8

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	CM	0,42	0,53	0,48	1,17	1,83	1,5	1,36	1,8	2,45	1,79
CD8	CM	0,21	0,67	2,65	1,79	0,33	0,72	0,91	0,67	1,99	2,22

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	CM	7,03	2,28	18,9	3,73	49,6	55,6	20,1	12,6	22,1	12,7
CD8	CM	5,05	1,6	11,4	3,37	25,8	26,4	21,6	19,8	11,1	7,59

Таблица 49 - Фигура 49: CD4+EM клетки и Фигура 23 CD8+EM клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	EM	90	н/о	98,3	98,9	83,9	97,2	84,1	99,8
CD8	EM	89,1	н/о	80,6	87,9	92,4	97,8	20,8	98,8

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	EM	95,6	84,4	84,5	83,4	84,3	73,7	80,6	80,4
CD8	EM	97,2	87,9	90,8	82,3	82,5	72,2	74,5	73

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	EM	99,4	99,4	96,7	97,4	97,1	97,8	97,4	97,6	9,62	95,3
CD8	EM	98,3	98,6	91,8	95,5	98,8	98,9	98,8	99,2	93,9	95,2

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	EM	91,7	97	74,3	90,7	36,2	25,5	73,9	81,8	73,1	76,4
CD8	EM	91,5	96,1	83	90,8	73,2	71,9	77,1	78,2	84,1	85,1

Таблица 50 - Фигура 51: CD4+CD28+ клетки и Фигура 25 CD8+CD28+ клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	CD28+	4,6	5,85	33,2	37	10,5	11,2	31,9	27,6
CD8	CD28+	30,1	34	24,5	23,1	83,8	49,3	22,5	15,5

Т-	Марке	M1061	M1062	M1063	M1064

клетки	ры	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	CD28+	6,75	7,18	21,6	27,8	18,6	15	23	27,6
CD8	CD28+	24,6	17,9	10	6,4	28,6	18,9	15,7	11

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	CD28+	41,7	38,2	63,2	59,8	3,97	3,29	12,2	17,5	8,27	7,48
CD8	CD28+	13,4	8,52	14,5	12	53	54,4	56,5	62,1	76,5	80,8

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	CD28+	12,3	15,2	13,3	20	6,22	9,29	12,3	16,5	15,4	17,9
CD8	CD28+	6,9	2,43	2,07	3,75	24	34	27	36,9	42	43,9

Таблица 51 - Фигура 53: CD4+PD-1+ клетки и Фигура 27 CD8+PD-1+ клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	PD-1+	48,5	н/о	н/о	н/о	77	40,6	н/о	22,4
CD8	PD-1+	37,1	н/о	н/о	н/о	56	24,6	н/о	14

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	PD-1+	36,8	34,2	15,7	26,7	43,9	66	32,4	14,5
CD8	PD-1+	40,4	35,3	6,3	6,21	18	20,4	35,6	23,2

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежи	Разм.	Свежи	Разм.	Свежи	Разм.	Свежи	Разм.	Свежи	Разм.

		e		e		e		e		e	
CD4	PD-1+	7,87	7,23	33,3	28,2	33,9	32,8	41,7	38	22,7	23,8
CD8	PD-1+	1,61	0,72	19,2	12,5	23,8	24,7	78,4	59,8	42,6	36,1

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	PD-1+	22,4	15,5	40,9	33,4	56	51,3	40,3	32,5	18,9	27,3
CD8	PD-1+	6,49	5,73	29,8	34,6	18,9	15,2	68,6	47	28,9	36,1

Таблица 52 - Фигура 55: CD4+LAG3+ клетки и Фигура 29 CD8+LAG3+ клетки

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.	Свежие	Размор.
CD4	LAG3+	16,8	н/о	н/о	н/о	93,5	37,3	н/о	6,8
CD8	LAG3+	74	н/о	н/о	н/о	98,4	81,5	н/о	31,8

Т-клетки	Маркеры	M1061		M1062		M1063		M1064	
		Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размор. ре-ПБР
CD4	LAG3+	68,3	73,1	35,2	56,9	26,9	27,3	52,6	64
CD8	LAG3+	98,3	98,7	97,1	97,7	89,6	85,1	92,8	94,7

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	LAG3+	47,2	30,5	35,5	20,1	25	27,4	48,6	38	14,5	7,65
CD8	LAG3+	85,3	38,7	89,6	64,2	83,4	81,9	93,2	66,3	90,3	71,1

Т-клетки	Маркеры	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР

CD4	LAG3+	65,8	68,2	40,9	46	44,1	39,1	52,1	51	48,5	17,7
CD8	LAG3+	95,4	97,8	92,4	92,5	97,5	98,4	98,2	98,3	97,7	78,1

Таблица 53 - Фигура 57: CD4+TIM-3+ клетки и Фигура 31 CD8+TIM-3+ клетки

Т-клетки	Маркеры	М1061		М1062		М1063		М1064	
		Свежие	Размер.	Свежие	Размер.	Свежие	Размер.	Свежие	Размер.
CD4	TIM3+	89,7	н/о	н/о	н/о	98,3	87,6	н/о	43,2
CD8	TIM3+	99	н/о	н/о	н/о	99,4	88,1	н/о	47

Т-клетки	Маркеры	М1061		М1062		М1063		М1064	
		Свежие ре-ПБР	Размер. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размер. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размер. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Размер. ре-ПБР
CD4	TIM3+	95,3	98	94,5	96,9	90,8	90,2	94,2	82,6
CD8	TIM3+	98,9	98,9	97,3	96,7	97,1	97,7	98,2	95,7

Т-клетки	Маркеры	М1065		ЕР11001		М1056		М1058		М1203	
		Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.	Свежие	Разм.
CD4	TIM3+	95	78,8	96,9	91,5	96,4	92,5	88,7	80,1	89,9	82,3
CD8	TIM3+	96,9	50,6	98,8	83	98,3	92,9	96,5	73,6	98,2	88,5

Т-клетки	Маркеры	М1065		ЕР11001		М1056		М1058		М1203	
		Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР	Свежие ре-ПБР	Разм. ре-ПБР
CD4	TIM3+	91,1	95,4	94,3	98,7	74	75,4	86,5	87,3	94,4	90,6
CD8	TIM3+	94,9	96,5	96,3	98,3	98	99	97,3	98,6	99	97,7

Таблица 54 - Фигура 61: Определение длины теломерных повторов методом кПЦР и Flow-FISH

Опухоль	М1061	М1062	М1063	М1064	М1065	ЕР11001	М1056	М1058	М1023
кПЦР	0,111878	0,135842	0,149685	0,179244	0,151774	0,137738	0,134904	0,124137	0,086569
Flow-	9,330236	1215041	8,782231	7,174627	8,961553	6112918	9,010615	7,944534	5,766692

FISH									

ПРИМЕР 20: Введение новых криоконсервированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (LN-144) пациентам с метастатической меланомой

[00871] В многоцентровом фазы 2 клиническом исследовании была продемонстрирована эффективность и переносимость введения новых криоконсервированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (LN-144) пациентам с метастатической меланомой.

Вводная информация

[00872] Безопасность и эффективность адоптивной клеточной терапии (АКТ) с использованием не криоконсервированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) была изучена на сотнях пациентов с метастатической меланомой. Данное многоцентровое клиническое исследование было начато с централизованно произведенными ОИЛ (LN-144) в виде не криоконсервированных и криоконсервированных инфузионных препаратов. Не криоконсервированные LN-144, полученные используемым авторами изобретения новым способом производства, используют в группе 1, и полученные сокращенным способом в течение 3 недель криоконсервированные LN-144 используют в группе 2. Используемый для группы 2 способ производства отличается сокращенной продолжительностью процесса, в сочетании с криоконсервированным препаратом ОИЛ, что допускает гибкий режим лечения и введения доз пациенту. Сокращенный способ производства позволяет уменьшить время ожидания для получения пациентом его препарата ОИЛ, и криоконсервирование делает более удобной логистику и доставку в клиники.

Методы

[00873] C-144-01 является проспективным, многоцентровым исследованием, в котором оценивают введение LN-144 пациентам с метастатической меланомой. После немиелоаблативной лимфодеплеции с предварительным режимом введения Cy/Flu пациенты получают одну инфузию LN-144, с последующим введением IL-2 (600000 МЕ/кг) вплоть до 6 доз. Пациентов оценивают в отношении объективного ответа в качестве основного определяемого параметра в течение срока вплоть до 24 месяцев.

Результаты

[00874] Авторы изобретения охарактеризовали криоконсервированные клетки LN-144 для введения второй группе пациентов, группе 2 (N=10), в соответствии с тем же режимом лечения до и после инфузии ОИЛ, который используют для группы 1.

[00875] Пациенты группы 2 получали усиленное лечение в рамках предшествующих линий терапии, при этом все пациенты получали лечение анти-CTLA-4 и анти-PD-1, и имели большую опухолевую нагрузку (средняя СД: 15,3; 10,9 см для групп 2, 1). Среднее число предшествующих методов лечения составляло 4, 3 для групп 2, 1, соответственно. Первичный анализ данных по безопасности показывает сопоставимую переносимость криоконсервированных LN-144. Профиль безопасности для пациентов группы 1, получающих не криоконсервированные LN-144, продолжает быть приемлемым

для популяции пациентов на такой поздней стадии. Наиболее распространенными НЯВЛ, наблюдаемыми в обеих группах, по частоте встречаемости являются тошнота, анемия, фебрильная нейтропения, уменьшение количества нейтрофилов, уменьшение количества тромбоцитов. Результаты раннего обзора данных по эффективности указывают на наличие противоопухолевой активности, включая ЧО, терапевтических ОИЛ, наблюдаемой у пациентов, получающих лечение в группе 2.

Выводы

[00876] Данное исследование является первым клиническим исследованием в многоцентровом формате с централизованно произведенными ОИЛ, в котором оценивают новый способ получения криоконсервированного аутологичного препарата с гораздо меньшей продолжительностью процесса (примерно 3 недели). Предварительные результаты свидетельствуют о том, что использование криоконсервированных LN-144 является безопасным и переносимым терапевтическим вариантом лечения для пациентов с метастатической меланомой, для которых были неэффективны несколько предыдущих методов лечения, включая использование ингибиторов контрольных точек. Криоконсервированные LN-144 обеспечивают большую гибкость режима лечения для пациентов и медицинского персонала, и позволяют ускорить лечение пациентов, которые остро нуждаются в лечении. NCT02360579.

ПРИМЕР 21: Оценка бессывороточной среды для использования в способе 2A

[00877] В данном примере приведены результаты оценки эффективности бессывороточной среды в качестве замены стандартных сред CM1, CM2 и CM4, в настоящее время используемых в способе 2A. В данном исследовании протестирована эффективность доступной бессывороточной среды (БСС) и бессывороточных альтернативных сред в качестве замены в трех фазах;

[00878] Фаза-1: определение эффективности 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.

[00879] Фаза-2: тестирование использования бессывороточной среды – кандидата в мелкомасштабном способе 2A с использованием G-Rex 5M (n=3).

Вводная информация

[00880] 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 2A.

Сокращения

мкл	микролитр
СМ1, 2, 4	полная среда 1, 2, 4
БСС CTS OpTimizer	бессывороточная среда Cell Therapy System OpTimizer
г	грамм
ч	час
IFU	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

[00881] Пре-ПБР и ПБР начинают, как описано в LAB-008. Обзор трех фаз эксперимента приведен на Фигуре 150.

[00882] Как показано на Фигуре 150, начинают проект для тестирования бессывороточных сред и добавок в два этапа.

[00883] Этап 1. Выбор поставщика бессывороточной среды. Организуют пре-ПБР и пост-ПБР для имитации способа 2A в 24-луночном планшете G-Rex. Пре-ПБР начинают путем культивирования каждого фрагмента/лунку 24-луночного планшета G-Rex в трех повторах или четырех повторах для каждого варианта. ПБР начинают в день 11 путем культивирования 4×10e5 ОИЛ/лунку 24-луночного планшета G-Rex, разделяют в день 16, собирают клетки в день 22. CTS OpTimizer, X-Vivo 20 и Prime T-CDM используют в качестве потенциальных альтернативных бессывороточных сред для использования в пре-ПБР и ПБР. Заменитель сыворотки CTS Immune (Life Technologies) или лизат тромбоцитов (SDBB) добавляют в концентрации 3% к БСС. Для каждого варианта запланировано тестирование по меньшей мере 3 опухолей как в пре-ПБР, так и в пост-ПБР для имитации способа 2A.

[00884] Этап 2. Идентифицированных кандидатов дополнительно тестируют в мелкомасштабном способе 2A в соответствии с протоколом (TP-17-007). Вкратце, пре-ПБР начинают путем культивирования 2 фрагментов/флакон G-Rex 5M в трех повторах для каждого варианта. ПБР начинают в день 11 с использованием 2×10e6/флакон G-Rex 5M, разделяют в день 16, собирают клетки в день 22.

[00885] **Примечание:** несколько опухолей обрабатывают и используют для

измерения нескольких параметров в одном эксперименте.

Наблюдения

[00886] Наблюдали эквивалентные или статистически достоверно лучшие результаты роста клеток при сравнении бессывороточных сред со стандартной средой, используемой в способе 2A.

[00887] 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 2A.

Результаты

Тестирование эффективности бессывороточной среды для размножения пре- и пост-ПБР ОИЛ.

[00888] **CTS Optimizer+3C (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% 3C CTS Immune CTS, тестировали в сравнении со стандартным вариантом. В случае M1079 и L4026 с вариантом CTS OpTimizer+3C наблюдали значительно увеличенное размножение пре-ПБР ОИЛ ($p < 0,05$) в сравнении со стандартным вариантом (CM1, CM2, CM4) (Фигура 62A). Напротив, вариант CTS Optimizer без 3C не способствовал размножению пре-ПБР ОИЛ (Приложение 1, 2, 3). В случае варианта CTS Optimizer+3C наблюдали сопоставимое размножение ОИЛ в пост-ПБР для двух из 3 протестированных опухолей (Фигура 2B). 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 стандартным вариантом (Фигура 62A). 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.

[00889] Тестирование варианта-кандидата в мелком масштабе с использованием G-Rex 5M (смотри Фигуру 64).

[00890] Фенотипический анализ пост-ПБР ОИЛ. Смотри Фигуру 66 и Таблицу 56, ниже.

Таблица 56: 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

[00891] Сопоставимость продуцирования интерферона-гамма

[00892] 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. Смотри Фигуру 67.

ПРИМЕР 22: Коктейль факторов роста Т-клеток IL-2/IL-15/IL-21 приводит к увеличению размножения и эффекторной функции опухоль-инфильтрирующих Т-клеток

[00893] 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 современных способах 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

[00894] Способ получения ОИЛ включает предварительный период до протокола быстрого размножения (пре-ПБР), в котором опухолевые фрагменты размером 1-3 $мм^3$ помещают в среду, содержащую IL-2. В процессе пре-ПБР ОИЛ выходят из опухолевых фрагментов и размножаются в ответ на стимуляцию IL-2.

[00895] Для дополнительной стимуляции роста ОИЛ клетки размножают во втором периоде культивирования, называемом протоколом быстрого размножения (ПБР), во время которого добавляют облученные питающие клетки МКПК, IL-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.

[00896] Этот сокращенный протокол получения ОИЛ использовали для оценки влияния только одного IL-2 в сравнении с сочетанием IL2/IL-15/IL-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 IFNγ) и репертуара TCR Vβ.

[00897] Пре-ПБР культивирование начинали с использованием стандартного протокола с IL-2 (600 МЕ/мл), или с IL-15 (180 МЕ/мл) и IL-21 (1 МЕ/мл) в дополнение к IL-2. Клетки оценивали в отношении размножения после завершения пре-ПБР. Считали, что в культуре имеет место усиленное размножение в сравнении с использованием IL-2, если общий рост увеличивался по меньшей мере на 20%. Фенотипические и функциональные исследования для меланомы и опухоли легкого приведены в настоящем документе. Смотри Таблицу 57, ниже.

Таблица 57: Увеличение размножения в процессе пре-ПБР при добавлении IL-2/IL-15/IL-21 в нескольких вариантах

Гистология опухоли	**Кол-во исследований IL-2 в сравнении с IL-2/IL-15/IL-21**	**Кол-во исследований, в которых отмечено увеличение на >20% роста клеток при использовании IL-2/IL-15/IL-21 (в сравнении с IL-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%)

[00898] Эти данные показывают увеличение выхода препарата ОИЛ в случае культивирования ОИЛ с IL-2/IL15/IL-21 по сравнению с использованием только IL-2, в дополнение к фенотипическим и функциональным отличиям для легкого.

[00899] Эффект тройного коктейля на размножение ОИЛ был специфическим для вида опухоли, и наиболее благоприятный эффект был отмечен для опухолей, отличающихся низким выходом.

[00900] Соотношение CD8+/CD4+ Т-клеток увеличивалось при использовании коктейля в препарате ОИЛ НМРЛ.

[00901] 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.

[00902] Данные, приведенные в настоящем документе, показывают, что размножение ОИЛ с использованием более короткого, более надежного способа, такого как способ 2A, 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.

[00903] В текущих экспериментах дополнительно оценивают эффекты IL-2/IL-15/IL-21 на функцию ОИЛ.

[00904] В дополнительных экспериментах будет оценен эффект тройного коктейля в процессе ПБР (первое размножение).

[00905] 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 23: Криоконсервирование ОИЛ, полученных сокращенным способом

Вводная информация

[00906] В данном примере описаны результаты, относящиеся к криоконсервированному препарату опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) LN-144, полученному сокращенным способом, подходящим для крупномасштабного коммерческого производства, обладающему благоприятными атрибутами качества для адоптивного переноса клеток (АПК).

[00907] Существующие способы получения клинических препаратов ОИЛ включают открытое вмешательство оператора, с последующими продолжительными периодами инкубации, для получения терапевтического препарата. Способ поколения 1 занимает примерно 6 недель, и в результате получают свежий препарат. С целью использования терапии ОИЛ для всех пациентов, которые могут потенциально получать от него пользу, был разработан сокращенный 22-дневный способ культивирования, способ поколения 2, подходящий для централизованного производства, с получением криоконсервированного лекарственного препарата, который может быть отправлен в отдаленные клиники. Способ поколения 2 представляет собой гибкий, надежный, закрытый и полу-автоматизированный способ получения клеток, который подходит для крупномасштабного промышленного производства. Лекарственные препараты, полученные этим способом, обладают атрибутами качества, сопоставимыми с таковыми при использовании способа поколения 1.

Цели исследования

[00908] Лекарственные препараты, полученные способом поколения 1 (вариант

осуществления способа 1C) и поколения 2 (вариант осуществления способа 2A), анализировали для определения сопоставимости с точки зрения следующих атрибутов качества:

Доза и кратность увеличения количества клеток.

Чистота Т-клеток и пропорциональное содержание подгрупп Т-клеток.

Фенотипическая экспрессия костимулирующих молекул на подгруппах Т-клеток.

Средняя относительная длина теломерных повторов.

Способность секретировать цитокин в ответ на реактивацию TCR.

Разнообразие Т-клеточных рецепторов.

Обзор способа ОИЛ-терапии

[00909] Экстракция: ОИЛ пациента извлекают из супрессивной микросреды опухоли (путем хирургической резекции лезии).

[00910] Размножение: ОИЛ размножают экспоненциально в культуре с IL-2, получая выход 10^9–10^{11} ОИЛ, перед введением их инфузией пациенту.

[00911] Предварительная подготовка: Пациент получает НМА-ЛД (немиелоаблативную лимфодеплецию, циклофосфамид: 60 мг/кг, в/в x 2 дозы и флударабин: 25 мг/м^2×5 доз) для элиминации потенциально супрессивной микросреды опухоли и максимального повышения эффективности приживления и активности ОИЛ при терапии.

[00912] Инфузия: Пациенту вводят инфузией собственные размноженные ОИЛ (LN-144) и в течение короткого срока высокую дозу IL-2 (600000 МЕ/кг вплоть до 6 доз) для стимуляции активации, пролиферации и противоопухолевой цитолитической активности ОИЛ.

Таблица 58: Краткий обзор усовершенствований способа производства поколения 2

Этап способа	Gen 1	Gen 2	Результат
Культивирование фрагментов	≤21 дней, несколько биореакторов, неоднократные вмешательства оператора	≤11 дней, один закрытый биореактор, без вмешательства оператора	Сокращение срока культивирования, уменьшение вмешательств, пригодность для автоматизации.
Отбор ОИЛ	Размноженные при помощи IL-2 ОИЛ криоконсервируют, тестируют, отбирают	≤200×10^6 суммарных ОИЛ непосредственно переводят в процесс	Сокращение процесса за счет возможности высевания

	на основании фенотипа, размораживают $\leq 30\times10^6$ ОИЛ для совместного культивирования	совместного культивирования	большего количества для совместного культивирования, сокращение количества этапов, устранение тестирования
Быстрое размножение	≤36 биореакторов, 14 дней	≤5 биореакторов, 11 дней	Уменьшение вмешательств оператора, закрытая система, сокращение процесса, пригодность для автоматизации.
Сбор/промывание клеток	Ручное открытое уменьшение объема и сбор клеток. Ручное промывание и концентрирование центрифугированием.	Закрытое полу-автоматизированное уменьшение объема и сбор клеток. Автоматизированное промывание и концентрирование.	Уменьшение вмешательств оператора, автоматизированный процесс, сохранение закрытой системы.
Формулирование	Свежий охлажденный препарат (2-8°C)	Криоконсервированный препарат (≤-150°C)	Гибкость условий транспортировки, расписания лечения пациента, облегчение тестирования для выпуска препарата, испытания в мировом масштабе

Время, затраченное на производство	38-дневный процесс	22-дневный процесс	Срок лечения пациента, увеличение пропускной способности чистых помещений, стоимость препарата

Аналитические методы и оборудование:

[00913] **Дозы и жизнеспособность:** отбирали образцы конечных сформулированных препаратов и анализировали на общее количество ядросодержащих клеток, общее количество жизнеспособных клеток; жизнеспособность определяли, используя контрастное окрашивание акридиновым оранжевым/DAPI, при помощи автоматического счетчика клеток NC-200.

[00914] **Проточная цитометрия:** отбирали образцы сформулированных лекарственных препаратов и анализировали на вид клеток методом FACS. Процентное содержание Т-клеток определяли на основании содержания CD45+,CD3+ популяций жизнеспособных клеток. Замороженные сателлитные или аварийные флаконы для каждого процесса размораживали и анализировали в отношении расширенных фенотипических маркеров, включая CD3, CD4, CD8, CD27 и CD28.

[00915] **Средняя относительная длина теломерных повторов**: использовали технологию Flow-FISH для измерения средней длины теломерных повторов. Данный анализ выполняли, как описано в протоколе для набора DAKO® Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry. Вкратце, 2×10^6 клеток ОИЛ объединяли с 2×10^6 лейкозных клеток линии 1301. ДНК денатурировали при 82°C в течение 10 минут, и зонд PNA-FITC гибридизовали в темноте в течение ночи при комнатной температуре. Пропидия йодид использовали для идентификации клеток в фазе G0/1.

[00916] **Иммуноанализы:** способность клеток лекарственного препарата секретировать цитокин при реактивации определяли после совместного культивирования с покрытыми мАт гранулами (Life Technologies, анти-CD3, анти-CD28 и анти-CD137). Через 24 часа культуральные супернатанты собирали, замораживали, размораживали и анализировали методом ELISA с использованием набора Quantikine IFNγ ELISA (R&D systems) согласно инструкциям производителя.

[00917] **Разнообразие Т-клеточных рецепторов:** РНК из клеток конечных сформулированных препаратов выделяли и проводили мультиплексную ПЦР с VDJ-специфическими праймерами. Последовательности CDR3, экспрессированные в препарате ОИЛ, полуколичественно амплифицировали для определения частоты встречаемости и

представленности уникальных клонов ОИЛ. Секвенирование проводили на настольном секвенаторе Illumina MiSeq. Значения индексировали для получения балльного показателя, представляющего относительное разнообразие Т-клеточных рецепторов в препарате.

Результаты и выводы:

[00918] Результаты представлены на Фигурах 75-81.

[00919] Способ поколения 2 позволяет получать препарат ОИЛ с качеством, сопоставимым с качеством препарата, получаемого способом поколения 1.

[00920] Способ поколения 2 позволяет получать сходные количества высокочистых препаратов ОИЛ, имеющих аналогичное пропорциональное содержание подгрупп Т-клеток, экспрессирующих сопоставимые количества костимулирующих молекул, в сравнении с препаратом, полученным способом Gen 1.

[00921] ОИЛ, полученные способом поколения 2, отличаются повышенным разнообразием TCR рецепторов, которые при активации инициируют надежную секрецию цитокинов.

[00922] Криоконсервированный лекарственный препарат позволяет принципиально повышать эффективность логистики, допуская гибкость в распределении.

[00923] В отличие от предшествующих способов, платформа сокращенного 22-дневного размножения в способе поколения 2 представляет собой масштабируемую и логистически осуществимую платформу производства ОИЛ, позволяющую быстро получать клинического масштаба дозы для пациентов, остро нуждающихся в лечении.

[00924] Протокол производства ОИЛ способа поколения 2 позволяет снять множество барьеров, препятствующих в настоящее время широкому применению ОИЛ-терапии.

ПРИМЕР 24: Оценка диапазона соотношений от 100:1 до 25:1 аллогенных питающих клеток и ОИЛ

[00925] 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 1C.

[00926] 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.

[00927] 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.

[00928] A. Объем Т-клетки (диаметр 10 мкм): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 523{,}6$ мкм^3

[00929] B. Колонка G-REX 100 (M) с 40-мкм (4 клетки) высотой: $V = (4/3)\,\pi r^3 = 4\times10^{12}$ мкм^3

[00930] C. Количество клеток, необходимое для заполнения колонки B: 4×10^{12} мкм^3/523,6 мкм^3=$7{,}6\times10^8$ мкм^3 * 0,64=$4{,}86\times10^8$

[00931] D. Количество клеток, которое может быть оптимально активировано в 4D пространстве: $4{,}86\times10^8/24=20{,}25\times10^6$

[00932] E. Количество питающих клеток и ОИЛ, экстраполированное на G-Rex 500: ОИЛ: 100×10^6 и питающих клеток: $2{,}5\times10^9$

[00933] Уравнение 1. Аппроксимация количества мононуклеарных клеток, необходимого для обеспечения икосаэдрической геометрии для активации ОИЛ в цилиндре с основанием 100 см^2. При расчетах получен экспериментальный результат $\sim5\times10^8$ 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

[00934] [(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.

[00935] [(2)] Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[00936] [(3)] O. R. Musin (2003). «The problem of the twenty-five spheres». Russ. Math. Surv. 58 (4): 794–795.

ПРИМЕР 25: Исследования основных атрибутов качества для препарата ОИЛ

Вводная информация

[00937] Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) продемонстрировала клиническую эффективность у пациентов с метастатической меланомой и другими опухолями[1-3].

[00938] Большинство отчетов клинических исследований включали исследовательские анализы инфузионных препаратов ОИЛ с целью определения атрибутов качества, таких как стерильность, идентификационные характеристики, чистота и активность, которые могут быть связаны с эффективностью и/или безопасностью препарата[4,5].

[00939] В настоящем документе авторы изобретения представляют результаты оценки трех основных параметров препарата ОИЛ, которые могут являться частью будущей платформы контроля качества для использования в промышленном производстве

ОИЛ.

Обзор метода лечения при помощи ОИЛ

[00940] 1. Опухоль резецируют у пациента и передают на производственное предприятие, соответствующее требованиям GMP.

[00941] 2. После получения опухоли ее фрагментируют и помещают во флаконы с IL-2 для процесса, предшествующего протоколу быстрого размножения (ПБР).

[00942] 3. Пре-ПБР ОИЛ затем размножают на этапе ПБР в присутствии облученных МКПК, анти-CD3 антитела (30 нг/мл) и IL-2 (3000 МЕ/мл).

[00943] 4. Препараты ОИЛ оценивают на важные атрибуты качества, включая: (1) идентификационные характеристики (2) чистоту и (3) активность.

[00944] 5. Перед инфузией размноженных ОИЛ (LN-144) пациент получает лечение с применением режима немиелоаблативной лимфодеплеции, состоящего из введения циклофосфамида и флударабина. После инфузии ОИЛ пациенту выполняют кратковременное введение (до 6 доз) высоких доз IL-2 (600000 МЕ/кг) для поддержки роста и приживления введенных ОИЛ.

Задачи исследования

[00945] Цель: полностью охарактеризовать препараты ОИЛ в отношении идентификационных характеристик, чистоты и активности, и тем самым (a) способствовать определению важных атрибутов качества и (b) способствовать установлению официальных критериев выпуска препарата, применяемых в коммерческом производстве препаратов ОИЛ.

[00946] Стратегия: разработать следующие аналитические методы для характеризации препаратов ОИЛ. В частности, были использованы следующие анализы: фенотипический анализ методом проточной цитометрии для оценки идентификационных характеристик и чистоты, анализ обнаружения остаточных опухолевых клеток для определения чистоты, а также анализ на секрецию интерферона-гамма для оценки активности.

Материалы и методы

Идентификационные характеристики и чистота

[00947] Фенотипические характеристики: препараты ОИЛ окрашивали анти-CD45, анти-CD3, анти-CD8, анти-CD4, анти-CD45RA, анти-CCR7, анти-CD62L, анти-CD19, анти-CD16 и анти-CD56 антителами и анализировали методом проточной цитометрии для количественного определения подгрупп Т и не-Т клеток.

Чистота

[00948] Анализ обнаружения остаточных опухолевых клеток: препараты ОИЛ окрашивали анти-MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан) и анти-CD45 антителами, а также красителем Live/Dead fixable Aqua dye, затем анализировали методом проточной цитометрии для обнаружения клеток меланомы. Контрольные препараты с добавленными опухолевыми клетками использовали для оценки точности обнаружения опухоли и установления критериев дискриминационного

окна для анализа данных.

Активность

[00949] Анализ секреции IFNγ: препараты ОИЛ рестимулировали покрытыми анти-CD3/CD28/CD137 гранулами в течение 18-24 часов, после чего супернатанты собирали для оценки секреции IFNγ методом ELISA.

Результаты

[00950] Идентификационные характеристики: большинство (>99%) препарата ОИЛ из меланомы составляли $CD45^+CD3^+$ клетки.

[00951] На Фигурах 86A-86C представлены фенотипические характеристики препаратов ОИЛ с использованием 10-цветного проточно-цитометрического анализа. (A) Процентную долю подгрупп Т-клеток и не Т-клеток определяли на основании $CD45^+CD3^+$ и CD45-(не лимфоцит)/$CD45^+CD3^-$ (не Т-клеточный лимфоцит), соответственно. В целом, протестированные препараты ОИЛ на >99% состояли из Т-клеток ($CD45^+CD3^+$). Показаны средние значения для препаратов ОИЛ (n=10). (B) Процентная доля двух подгрупп Т-клеток, включающих $CD45^+CD3^+CD8^+$ (синие незаштрихованные кружки) и $CD45^+CD3^+CD4^+$ (розовые незаштрихованные кружки). Статистически значимая разница в процентных долях обеих подгрупп отсутствовала при анализе с использованием непарного критерия Стьюдента (P=0,68). (C) Не Т-клеточная популяция была охарактеризована в отношении четырех разных подгрупп, включая: 1) не лимфоциты ($CD45^-$), 2) NK-клетки ($CD45^+CD3^-CD16^+/56^+$), 3) B-клетки ($CD45^+CD19^+$) и 4) не NK/B-клетки ($CD45^+CD3^-CD16^-CD56^-CD19^-$).

[00952] Идентификационные характеристики: большинство клеток в препарате ОИЛ из меланомы имели фенотип эффекторных Т-клеток или Т-клеток памяти, связанный с цитотоксической функцией Т-клеток.

[00953] На Фигурах 87A и 87B показаны характеристики подгрупп Т-клеток в CD45+CD3+CD4+ и CD45+CD3+CD8+ клеточных популяциях. Подгруппы Т-клеток, включая необученные клетки, центральные клетки памяти (TCM), эффекторные клетки памяти (TEF) и эффекторные RA+(EMRA) клетки памяти, определяли на основании CD45RA и CCR7. Фигуры 87A и 87B показывают репрезентативные подгруппы Т-клеток из 10 конечных препаратов ОИЛ как в CD4+ (A), так и в CD8+ (B) клеточных популяциях. Подгруппа эффекторных Т-клеток памяти (синие незаштрихованные кружки) является основной популяцией (>93%) и в CD4+, и в CD8+ подгруппах ОИЛ конечного препарата. Менее 7% клеток препаратов ОИЛ относятся к подгруппе центральных клеток памяти (розовые незаштрихованные кружки). Подгруппы EMRA (серые незаштрихованные кружки) и необученных (черные незаштрихованные кружки) клеток едва поддаются определению в препарате ОИЛ (<0,02%). P-значения представляют разницу между EM и CM, определенную с использованием непарного критерия Стьюдента.

[00954] Чистота: MCSP является подходящим опухолевым маркером меланомы для анализа чистоты.

[00955] На Фигурах 88A и 88B показано определение экспрессии MCSP и EpCAM

в опухолевых клетках меланомы. Опухолевые линии клеток меланомы (WM35, 526 и 888), линии клеток меланомы, полученные от пациентов способами, описанными в настоящем документе (1028, 1032 и 1041), и линию клеток колоректальной аденокарциномы (HT29 в качестве отрицательного контроля) характеризовали путем окрашивания на маркеры MCSP (ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан) и EpCAM (молекула клеточной адгезии эпителия). (A) В среднем, 90% опухолевых клеток меланомы экспрессируют MCSP. (B) Экспрессия EpCAM не была обнаружена в опухолевых линиях клеток меланомы при сравнении с положительным контролем HT29, EpCAM+ опухолевой линией клеток.

[00956] Чистота: разработка проточно-цитометрического анализа для обнаружения остаточных опухолевых клеток в препаратах ОИЛ.

[00957] На Фигурах 89A и 89B показан анализ контролей с добавленными клетками для определения точности обнаружения опухолей. Анализ проводили путем добавления известного количества опухолевых клеток в суспензию МКПК (n=10). MCSP+526 опухолевые клетки меланомы разбавляли в пропорциях 1:10, 1:100 и 1:1000, затем смешивали с МКПК и окрашивали анти-MCSP и анти-CD45 антителами и красителем для определения живых/мертвых клеток, и анализировали методом проточной цитометрии. (A) Было обнаружено примерно 3000, 300 и 30 клеток при разведении 1:10, 1:100 и 1:1000, соответственно. (B) Среднее значение (среднее) и стандартное отклонение (SD) для клеток в каждом случае использовали для определения верхних и нижних эталонных пределов.

[00958] Чистота: определение пригодности анализа обнаружения остаточных опухолевых клеток с использованием контролей с добавленными клетками.

[00959] На Фигурах 90A и 90B показаны результаты исследования воспроизводимости результатов для верхних и нижних пределов в контролях с добавленными клетками. Проводили три независимых эксперимента в трех повторах для определения воспроизводимости анализа с добавлением клеток. (A) Количества обнаруженных $MCSP^+$ опухолевых клеток были постоянными в диапазоне верхних и нижних эталонных пределов. (B) График линейной регрессии демонстрирует корреляцию между $MCSP^+$ клетками и разбавлениями при добавлении клеток (R^2=0,99), при этом сплошная черная линия показывает наилучшее соответствие. Зеленые и серые прерывистые линии представляют 95% пределы предсказания в стандартной кривой и образцах (эксперименты № 1-3), соответственно.

[00960] Чистота: примеси опухолевых клеток меланомы были ниже пределов обнаружения анализа в конечном препарате ОИЛ.

[00961] На Фигурах 91A и 91B показаны результаты обнаружения остаточной опухоли меланомы в препаратах ОИЛ. Препараты ОИЛ оценивали на остаточные примеси опухоли с использованием разработанного анализа (n=15). Среднее количество и процентная доля поддающихся обнаружению событий MCSP+ составляли 2 и 0,0002%, соответственно.

[00962] Активность: секреция IFNγ ОИЛ (постоянно >1000 пг/мл) продемонстрировала наличие эффекторной функции в препарате ОИЛ.

[00963] На Фигуре 92 показаны результаты оценки активности препаратов ОИЛ после активации Т-клеток. Секрецию IFNγ после рестимуляции анти-CD3/CD28/CD137 в препаратах ОИЛ оценивали методом ELISA в двух повторах (n=5). Секреция IFNγ в препаратах ОИЛ была значительно выше, чем в не стимулированных контролях, при анализе с использованием критерия знаковых рангов Вилкоксона (P=0,02), и постоянно на уровне >1000 пг/мл. Секрецию IFNγ на уровне >200 пг/мл считают эффективной. P-значение <0,05 считается статистически значимым.

Заключение

[00964] Были оценены ключевые параметры препарата, включающие идентификационные характеристики, чистоту и активность препаратов ОИЛ. Препараты ОИЛ, произведенные способами, описанными в настоящем документе, состояли более чем на 99% из CD45+CD3+ Т-клеток. Большинство CD4+ и CD8+ подгрупп ОИЛ имели фенотип эффекторных клеток - клеток памяти, связанный с цитотоксической функцией Т-клеток. Анализ методом проточной цитометрии для обнаружения примесей опухолевых клеток меланомы в конечном препарате ОИЛ был успешно разработан и проверен на пригодность. С использованием данного анализа было показано, что примеси опухолевых клеток меланомы в конечном препарате ОИЛ были ниже пределов обнаружения анализа. Секреция IFNγ клетками конечного препарата ОИЛ после рестимуляции анти-CD3/CD28/CD137 может служить в качестве анализа на активность при коммерческом производстве ОИЛ. Эти данные создают основу платформы контроля качества, что будет способствовать дальнейшей разработке важных атрибутов качества при коммерческом производстве препаратов ОИЛ.

ПРИМЕР 26: Криоконсервированный препарат ОИЛ, полученный сокращенным способом, подходящим для крупномасштабного коммерческого производства, проявляет подходящие атрибуты качества для адоптивного переноса клеток

Вводная информация

[00965] Классические способы получения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) для адоптивного переноса клеток (АПК) включают несколько этапов ex vivo инкубации для получения свежего (не криоконсервированного) инфузионного препарата.

[00966] Способ первого поколения (Gen 1) позволяет получать дозу свежих ОИЛ примерно через 6 недель. Был разработан способ производства ОИЛ второго поколения (Gen 2), который позволяет сокращать продолжительность ex vivo культивирования до 22 дней (Фигура 93).

[00967] Способ Gen 2 подходит для централизованного производства и позволяет получать криоконсервированный инфузионный препарат ОИЛ, обеспечивающий удобство в планировании лечения, логистике и доставке в клиники. Криоконсервированный инфузионный препарат ОИЛ LN-144, полученный способом Gen 2, обладает атрибутами

качества, сопоставимыми с таковыми у не криоконсервированного инфузионного препарата ОИЛ, полученного способом Gen 1. Способ Gen 2 производства ОИЛ представляет собой гибкий, надежный, закрытый и полуавтоматический способ получения клеток, подходящий для широкомасштабного коммерческого производства ОИЛ.

Цели исследования

[00968] Инфузионные препараты ОИЛ, полученные способами производства Gen 1 и Gen 2, оценивали для определения сопоставимости в отношении следующих атрибутов качества: (1) количество клеток (доза), жизнеспособность, скорость роста в фазе ПБР, (2) чистота Т-клеток и фенотипическая экспрессия костимулирующих молекул на подгруппах Т-клеток, (3) средняя относительная длина теломерных повторов, (4) способность секретировать IFNγ в ответ на связывание CD3, CD28, CD137 и (5) разнообразие Т-клеточных рецепторов, присутствующих на клетках конечного инфузионного препарата (Фигура 94).

Аналитические методы и оборудование

[00969] Количество и жизнеспособность клеток: отбирали образцы конечных сформулированных инфузионных препаратов и анализировали на общее количество ядросодержащих клеток, общее количество жизнеспособных клеток; жизнеспособность определяли, используя контрастное окрашивание акридиновым оранжевым/DAPI, при помощи автоматического счетчика клеток NC-200. Лоты для разработки процесса анализировали на счетчике жизнеспособных клеток Nexcellom Cellometer K2 Cell Viability Counter с использованием двойного флуоресцентного окрашивания акридиновым оранжевым/пропидия йодидом.

[00970] Фенотипические маркеры: отбирали образцы сформулированных инфузионных препаратов и анализировали на идентификационные характеристики методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Процентное содержание Т-клеток определяли на основании содержания CD45+,CD3+ (дважды положительных) популяций жизнеспособных клеток. Замороженные сателлитные или аварийные флаконы для каждого процесса размораживали и анализировали в отношении расширенных фенотипических маркеров, включая CD3, CD4, CD8, CD27 и CD28. Свежие инфузионные препараты оценивали на приборе BD FACS Canto II, а расширенные фенотипические маркеры на размороженных инфузионных препаратах оценивали на приборе Bio-Rad ZE5 Cell Analyzer.

[00971] Средняя относительная длина теломерных повторов: использовали технологию Flow-FISH для измерения средней длины теломерных повторов. Данный анализ выполняли, как описано в протоколе для набора DAKO® Telomere PNA Kit/FITC for Flow Cytometry. Вкратце, 2×10^6 клеток ОИЛ объединяли с 2×10^6 клеток линии (1301) лейкоза человека. ДНК денатурировали при 82°C в течение 10 минут, и зонд PNA-FITC гибридизовали в темноте в течение ночи при комнатной температуре. Пропидия йодид использовали для идентификации клеток в фазе G0/1.

[00972] Иммунная функция: способность клеток инфузионного препарата секретировать IFNγ при реактивации определяли после совместного культивирования с покрытыми мАт гранулами (Life Technologies, анти-CD3, анти-CD28 и анти-CD137). Через 24 часа культуральные супернатанты собирали, замораживали, размораживали и анализировали методом ELISA с использованием набора Quantikine IFNγ ELISA (R&D systems) согласно инструкциям производителя.

[00973] Разнообразие Т-клеточных рецепторов: РНК из клеток инфузионных препаратов выделяли и проводили мультиплексную ПЦР с VDJ-специфическими праймерами. Последовательности CDR3, экспрессированные в препарате ОИЛ, полуколичественно амплифицировали для определения частоты встречаемости и представленности уникальных клонов ОИЛ. Секвенирование проводили на настольном секвенаторе Illumina MiSeq. Значения индексировали для получения балльного показателя, представляющего относительное разнообразие Т-клеточных рецепторов в препарате.

Результаты

[00974] В день 22 клеточный препарат в уменьшенном объеме объединяли и отбирали образец для определения состояния культуры перед промыванием и формулированием. На Фигурах 95A-95C показано общее количество жизнеспособных клеток, скорость роста и жизнеспособность. (A) Образцы анализировали на автоматическом счетчике клеток NC-200, как описано ранее. Общую плотность жизнеспособных клеток определяли путем подсчета общего среднего значения для полученных в двух повторах результатов для 4 независимых образцов. Способ Gen 2 приводил к выходу препарата ОИЛ в дозе, аналогичной таковой при использовании способа Gen 1 (Gen 1 среднее=$4{,}10\times10^{10} \pm 2{,}8\times10^{10}$, Gen 2 среднее=$4{,}12\times10^{10} \pm 2{,}5\times10^{10}$). (B) Скорость роста рассчитывали для фазы ПБР по формуле. (C) Жизнеспособность клеток оценивали для 9 лотов, используемых для разработки процесса, при помощи Cellometer K2, как описано ранее. Существенное уменьшение жизнеспособности клеток отсутствовало после одного цикла замораживания-размораживания сформулированного препарата. Среднее уменьшение жизнеспособности при размораживании и отборе образца составляло 2,19%.

[00975] На Фигурах 96A-96C показано, что препараты, полученные способом Gen 2, представляют собой высокочистые культуры Т-клеток, экспрессирующих костимулирующие молекулы на уровнях, сопоставимых с уровнями в Gen 1. (Фигура 96A) Свежие сформулированные препараты лекарственного средства анализировали на идентификационные характеристики методом проточной цитометрии для выпуска. Способы Gen 1 и Gen 2 приводили к получению высокочистых Т-клеточных культур при определении на основании CD45+CD3+ (дважды положительного) фенотипа. (Фигуры 96B и 96C) Криоконсервированные сателлитные флаконы со сформулированным препаратом лекарственного средства размораживали и анализировали на расширенный фенотип методом проточной цитометрии, как описано ранее. Препараты, полученные

способами Gen 1 и Gen 2, имели сходные уровни экспрессии костимулирующих молекул CD27 и CD28 в подгруппах Т-клеток. Костимулирующие молекулы, такие как CD27 и CD28, могут быть необходимы для обеспечения вторичной и третичной сигнализации, необходимой для пролиферации эффекторных клеток при связывании с Т-клеточным рецептором. Р-значение рассчитывали с использованием критерия Манна-Уитни.

[00976] На Фигуре 97 показано, что в полученных способом Gen 2 препаратах наблюдается тенденция к большей относительной длине теломер. Использовали технологию Flow-FISH для измерения средней длины теломерных повторов, как описано ранее. Значение ОДТ показывает, что средняя интенсивность флуоресценции теломер на хромосому/геном в препаратах Gen 1 составляла 7,5% ± 2,1%, а в препаратах Gen 2 составляла 8,4% ± 1,8% от флуоресценции теломер на хромосому/геном в клетках контрольной линии (линии 1301 клеток лейкоза). Данные показывают, что полученные способом Gen 2 препараты в среднем имеют сопоставимые длины теломер при сравнении с препаратами, полученными способом Gen 1. Длина теломер является суррогатным показателем продолжительности ex vivo культивирования клеток.

[00977] На Фигуре 98 показано, что полученные способом Gen 2 лекарственные препараты секретируют IFNγ в ответ на связывание CD3, CD28 и CD137. Криоконсервированные лекарственные препараты размораживали и инкубировали с покрытыми антителами гранулами, как описано ранее. Данные представлены в виде количества IFNγ, продуцируемого 5×10^5 жизнеспособных клеток за 24 часа. Полученные способом Gen 2 лекарственные препараты проявляют повышенную способность к продуцированию IFNγ при реактивации, в сравнении с полученными способом Gen 1 лекарственными препаратами. Способность клеток лекарственного препарата к реактивации и секреции цитокина является суррогатным показателем in vivo функции при связывании TCR с соответствующим антигеном в контексте HLA.

[00978] На Фигурах 99A и 99B показано, что полученные способом Gen 2 лекарственные препараты имеют большее разнообразие уникальных Т-клеточных рецепторов. Разнообразие Т-клеточных рецепторов оценивали следующим образом. РНК из 10×10^6 ОИЛ из полученных способами Gen 1 и Gen 2 инфузионных препаратов анализировали для определения общего количества и частоты встречаемости уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в каждом препарате. (Фигура 99A) Уникальные последовательности CDR3 были индексированы относительно частоты в каждом препарате для получения балльного показателя, репрезентативного для общего разнообразия Т-клеточных рецепторов в препарате. (Фигура 99B) Среднее общее число уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в каждом инфузионном препарате. Препараты ОИЛ, полученные обоими способами, состояли из поликлональных популяций Т-клеток с разной антигенной специфичностью и авидностью. Ширина общего Т-клеточного репертуара может быть показателем количества потенциально используемых эпитопов, присутствующих на опухолевых клетках.

Заключение

[00979] Способ производства Gen 2 позволил получить инфузионный препарат ОИЛ (LN-144) с атрибутами качества, сопоставимыми с таковыми при использовании способа Gen 1. Способом Gen 2 были получены аналогичные дозы высокочистых ОИЛ. Подгруппы Т-клеток находились в аналогичных пропорциях и экспрессировали костимулирующие молекулы на сопоставимых уровнях в сравнении с препаратами, полученными способом Gen 1. В полученных способом Gen 2 ОИЛ наблюдалась тенденция к большей относительной длине теломер, что согласуется с сокращенным периодом культивирования ex vivo. Полученные способом Gen 2 ОИЛ демонстрировали большее разнообразие TCR рецепторов, которые при связывании инициировали надежную секрецию IFN-γ, показатель цитолитической эффекторной функции. Таким образом, сокращенный 22-дневный закрытый способ Gen 2 для размножения клеток, в сочетании с криоконсервированным инфузионным препаратом, представляет собой масштабируемую и логистически осуществимую платформу производства ОИЛ, позволяющую быстро получать клинического масштаба дозы для страдающих от рака пациентов, срочно нуждающихся в новом методе лечения.

Литература

[00980] [1]Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. J Clin Oncol 23, 2346-2357, doi:10.1200/JCO.2005.00.240 (2005).

[00981] [2]Chandran, S. S. et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. Lancet Oncol, doi:10.1016/S1470-2045(17)30251-6 (2017).

[00982] [3]Stevanovic, S. et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. J Clin Oncol 33, doi:10.1200/jco.2014.58.9093 (2015).

[00983] [4]FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), 21 CFR 610.3(r), 2008.

[00984] [5]Richards JO, Treisman J, Garlie N, Hanson JP, Oaks MK. Flow cytometry assessment of residual melanoma cells in tumor-infiltrating lymphocyte cultures. Cytometry A 2012; 81:374-81.

ПРИМЕР 27: Коктейль факторов роста Т-клеток IL-2/IL-15/IL-21 приводит к увеличению размножения и эффекторной функции опухоль-инфильтрирующих Т-клеток в новом способе, описанном в настоящем документе

Вводная информация

[00985] Адоптивная Т-клеточная терапия аутологичными 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 современных способах

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 вариантах осуществления способа 2A и способах поколения 2 для производства ОИЛ.

Получение ОИЛ с использованием нового способа, описанного в настоящем документе

[00986] Опухоль резецируют у пациента и передают на производственное предприятие, соответствующее требованиям GMP. После получения опухоли ее фрагментируют и помещают во флаконы с IL-2 для процесса, предшествующего протоколу быстрого размножения (ПБР), на 11 дней. Для исследований с тройным коктейлем IL-2, IL-15 и IL-21 (IL-2/IL-15/IL-21) добавляли при инициации пре-ПБР. Для протокола быстрого размножения (ПБР) ОИЛ культивировали с питающими клетками и анти-CD3 антителом в течение дополнительных 11 дней (Фигура 100).

Материалы и методы

[00987] Способ получения ОИЛ включает предварительный период до протокола быстрого размножения (пре-ПБР), в котором опухолевые фрагменты размером 1-3 $мм^3$ помещают в среду, содержащую IL-2. В процессе пре-ПБР ОИЛ выходят из опухолевых фрагментов и размножаются в ответ на стимуляцию IL-2.

[00988] Для дополнительной стимуляции роста ОИЛ клетки размножают во втором периоде культивирования, называемом протоколом быстрого размножения (ПБР), во время которого добавляют облученные питающие клетки МКПК, IL-2 и анти-CD3. Был разработан сокращенный протокол размножения пре-ПБР и ПБР для размножения ОИЛ, с сохранением фенотипических и функциональных характеристик конечного препарата ОИЛ. Этот сокращенный протокол получения ОИЛ использовали для оценки влияния только одного IL-2, в сравнении с сочетанием IL2/IL-15/IL-21, добавляемым на этапе пре-ПБР. 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 IFNγ) и репертуара TCR Vβ.

[00989] Исследование показало увеличение размножения в процессе пре-ПБР при добавлении IL-2/IL-15/IL-21 в случае нескольких видов опухолей. Пре-ПБР культивирование начинали с использованием стандартного протокола с IL-2 (600 МЕ/мл), или с IL-15 (180 МЕ/мл) и IL-21 (1 МЕ/мл) в дополнение к IL-2 (Фигура 101). Клетки оценивали в отношении размножения после завершения пре-ПБР. Считали, что в культуре имеет место усиленное размножение в сравнении с использованием IL-2, если общий рост увеличивался по меньшей мере на 20%. Фенотипические и функциональные исследования меланомы и рака легкого дополнительно описаны в следующих далее параграфах (текст жирным шрифтом на Фигуре 101).

[00990] Коктейль IL-2/IL-15/IL-21 приводил к увеличению содержания CD8+

клеток в случае карциномы легкого, но не меланомы. На Фигурах 102A и 102B ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически на наличие CD4+ и CD8+ клеток методом проточной цитометрии после пре-ПБР. P-значение относится к разнице между условиями с IL-2 и IL-12/IL-15/IL-21 при использовании непарного критерия Стьюдента.

[00991] Экспрессия CD27 была слегка повышена в CD8+ клетках в культурах с добавлением IL-2/IL-15/IL-21. На Фигурах 103A и 103B ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=7), оценивали фенотипически на присутствие CD27+ и CD28+ в CD4+ и CD8+ клетках методом проточной цитометрии после пре-ПБР. Экспрессия CD27, клеточного маркера, связанного с более молодым фенотипом, коррелирующим с результатами адоптивной Т-клеточной терапии, была слегка повышена в CD8+ ОИЛ, полученных при культивировании с добавлением IL-2/IL-15/IL-21, в сравнении с добавлением только IL-2.

[00992] Подгруппы Т-клеток оставались без изменения при добавлении IL-15/IL-21. На Фигурах 104A и 104B ОИЛ оценивали фенотипически в отношении подгрупп эффекторных клеток/клеток памяти (CD45RA и CCR7) в CD8+ и CD4+ (данные не представлены) клетках из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=8) методом проточной цитометрии после пре-ПБР. TEM=эффекторные клетки памяти (CD45RA-, CCR7-), TCM=центральные клетки памяти (CD45RA-, CCR7+), TSCM=стволовые клетки памяти (CD45RA+, CCR7+), TEMRA=эффекторные Т-клетки (CD45RA+CCR7-).

[00993] Функциональная активность ОИЛ была дифференциально повышена при добавлении IL-2/IL-15/IL-21. На Фигурах 105A и 105B ОИЛ, полученные из (A) меланомы (n=4) и (B) опухоли легкого (n=5), оценивали в отношении экспрессии CD107a+ в ответ на стимуляцию PMA в течение 4 часов в CD4+ и CD8+ клетках методом проточной цитометрии. (C) пре-ПБР ОИЛ, полученные из меланомы и опухоли легкого, стимулировали в течение 24 часов растворимым анти-CD3 антителом, и супернатанты оценивали в отношении IFNγ методом ELISA.

[00994] Относительная частота репертуара TCRvβ менялась в ответ на добавление IL-2/IL-15/IL-21 в случае опухоли легкого, но не меланомы. На Фигурах 106A и 106B репертуар TCRvβ (24 специфичности) оценивали в ОИЛ, полученных из (A) меланомы и (B) опухоли легкого, с использованием набора для проточной цитометрии Beckman Coulter.

Резюме

[00995] В данном исследовании продемонстрирована способность коктейля IL-2/IL-15/IL-21 вызывать увеличение количества ОИЛ в сравнении с одним только IL-2 (>20%) в способе поколения 2, помимо оказания влияния на фенотипические и функциональные характеристики.

[00996] Эффект тройного коктейля на размножение ОИЛ зависел от гистологии опухолей. Соотношение CD8+/CD4+ Т-клеток было увеличено при добавлении IL-2/IL-15/IL-21 в препаратах из опухолей легкого. Добавление IL-15 и IL-21 приводило к

увеличению экспрессии CD107a и продуцирования IFNγ в ОИЛ, полученных из опухолей легкого. Добавление IL-2/IL-15/IL-21 приводило к изменению репертуара TCRvβ в случае опухоли легкого. Способ поколения 2 для размножения ОИЛ использовали с добавлением коктейля цитокинов IL-2/IL-15/IL-21, тем самым создавая возможность для дополнительной стимуляции размножения ОИЛ в опухолях с конкретной гистологией, таких как опухоль легкого и колоректальная опухоль. 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 28: Новые криоконсервированные опухоль-инфильтрирующие лимфоциты (LN-144), введенные пациентам с метастатической меланомой, продемонстрировали эффективность и переносимость в многоцентровом фазы 2 клиническом исследовании

Вводная информация

[00997] Безопасность и эффективность адоптивной клеточной терапии (АКТ) с использованием не криоконсервированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) была изучена на сотнях пациентов с метастатической меланомой, и при этом были получены значимые и надежные показатели частоты объективных ответов (ЧОО).[1] В текущем исследовании фазы 2, C-144-01, оценивали использование централизованно изготовленных в соответствии с требованиями GMP ОИЛ, как не криоконсервированных, полученных способом поколения 1 (Gen 1), так и криоконсервированных, полученных способом поколения 2 (Gen 2).

[00998] Gen 1 имеет срок производства примерно 5-6 недель (препарат, вводимый пациентам в группе 1 исследования C-144-01), в то время как Gen 2 имеет срок производства 22 дня (способ 2A, препарат, вводимый пациентам в группе 2 исследования C-144-01). Предварительные данные для пациентов группы 1, которым вводили полученный способом Gen 1 препарат LN-144, были обнадеживающими для лечения пациентов с пост-PD-1 метастатической меланомой, поскольку терапия ОИЛ вызвала ответы у пациентов.[2] Преимущества способа Gen 2 включают: (A) сокращение срока ожидания инфузии ОИЛ пациенту у пациентов и врачей; (B) криоконсервирование допускает гибкость в планировании лечения, распределении и доставке; и (C) сокращение производственных затрат. Предварительные данные для пациентов группы 2 приведены в настоящем документе. На Фигуре 107 показан вариант осуществления способа Gen 2 для производства криоконсервированного препарата LN-144 (способ 2A).

Дизайн исследования: C-144-01 исследование фазы 2 с участием пациентов с метастатической меланомой

[00999] Многоцентровое, с тремя группами, исследование фазы 2 для оценки эффективности и безопасности введения аутологичных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (LN‑144) для лечения пациентов с метастатической меланомой.

[001000] Ключевые критерии включения в исследование: (1) поддающаяся

измерению метастатическая меланома с возможностью резекции ≥1 лезии для получения ОИЛ; (2) прогрессирование болезни после по меньшей мере одного предшествующего курса системной терапии; (3) возраст ≥18 лет; и (4) ECOG PS 0-1.

[001001] Группы лечения: (1) не криоконсервированный препарат LN-144; (2) криоконсервированный препарат LN-144 и (3) повторное лечение LN-144 пациентов с отсутствием ответа или с прогрессированием заболевания после начального ответа. На Фигуре 108 представлен дизайн исследования.

[001002] Определяемые параметры: (1) основной: эффективность, определяемая как ЧОО, и (2) вторичный: безопасность и эффективность.

Методы

[001003] Группа 2, выборка для оценки безопасности: 13 пациентов, перенесших резекцию с целью получения ОИЛ, и получавших любой компонент исследуемого лечения.

[001004] Группа 2, выборка для оценки эффективности: 9 пациентов, предварительно получивших лечение с использованием режима НМА-ЛД, инфузию LN-144 и по меньшей мере одну дозу IL-2, и прошедших по меньшей мере одну оценку эффективности. 4 пациента не прошли оценку эффективности на момент прекращения сбора данных.

[001005] Данные по биомаркерам были показаны для всех доступных данных к дате прекращения сбора данных.

Результаты

[001006] На Фигуре 109 представлена таблица, иллюстрирующая сравнение характеристик пациентов из группы 1 (ASCO 2017) и из группы 2. В группе 2: в среднем 4 предшествующих курса лечения; все пациенты ранее получали анти-PD-1 и анти-CTLA-4; и имели высокую опухолевую нагрузку, выражаемую в виде общей суммы диаметров (СД), для целевых лезий и высокое среднее значение LDH в начале исследования. На Фигуре 110 представлена таблица, показывающая нежелательные явления, возникающие в ходе лечения (≥30%).

[001007] Для группы 2 (криоконсервированный LN-144) характеристики инфузионного препарата и терапии ОИЛ были следующими: (1) среднее количество вводимых инфузией клеток ОИЛ: 37×10^9, и (2) среднее количество введений доз IL-2 составляло 4,5. На Фигуре 111 показана эффективность инфузионного препарата и терапии ОИЛ для пациентов №1 - №8.

[001008] На Фигуре 112 показан клинический статус пациентов, подходящих для оценки ответа, со стабильным заболеванием (СЗ) или лучшим ответом. Частичный ответ (ЧО) у пациента 6 был не подтвержден, поскольку для пациента пока еще не была проведена вторая оценка эффективности. Один пациент (пациент 9) скончался до проведения первой оценки (все еще считается входящим в выборку для оценки эффективности).

[001009] Из 9 пациентов в выборке для оценки эффективности один пациент

(пациент 9) не мог быть оценен (Н/О) вследствие вызванной меланомой смерти до проведения первой оценки опухоли и не представлен на Фигуре 112. Ответы были отмечены у пациентов, получавших лечение препаратом Gen 2. Частота контроля заболевания (ЧКЗ) составляла 78%. Время до развития ответа было аналогично таковому в группе 1. Один пациент (пациент 3) с прогрессирующим заболеванием (ПЗ) в качестве наилучшего ответа не включен в график «плавательные дорожки».

[001010] На Фигуре 113 показано изменение, в процентах, суммы диаметров. Для пациента 9 не проводили оценку заболевания после введения LN-144 вследствие вызванной меланомой смерти до дня 42. День -14: изменение (%) суммы диаметров от этапа скрининга до начала исследования (день -14). День -14 - день 126: изменение (%) СД от начала исследования. День -14=начало исследования. День 0=инфузия LN-144.

[001011] После введения ОИЛ наблюдали увеличение HMGB1 (Фигура 114). Уровни HMGB1 в плазме измеряли с использованием набора HMGB1 ELISA (Tecan US, Inc). Показанные данные представляют кратность изменения уровней HMGB1 до (день -7) и после (день 4 и день 14) инфузии LN-144 у пациентов в группе 1 и группе 2 (p-значения рассчитывали с использованием двустороннего парного критерия Стьюдента на основе логарифмически преобразованных данных). Размер выборки (жирный шрифт, курсив) и средние значения (курсив) показаны в скобках для каждой временной точки. HMGB1 секретируется активированными иммунными клетками и высвобождается поврежденными опухолевыми клетками. Таким образом, повышенные уровни HMGB1, наблюдаемые после введения LN-144, указывают на опосредованный иммунными клетками механизм противоопухолевой активности.

[001012] Уровни IP-10 в плазме измеряли с использованием анализа Luminex. Данные, представленные на Фигуре 115, показывают кратность изменения уровней IP-10 до (день -7) и после (день 4 и день 14) инфузии LN-144 у пациентов в группе 1 и группе 2 (p-значения рассчитывали с использованием двустороннего парного критерия Стьюдента на основе логарифмически преобразованных данных). Размер выборки (жирный шрифт, курсив) и средние значения (курсив) показаны в скобках для каждой временной точки. Увеличение уровня IP-10 после инфузии LN-144 контролируют для выяснения возможной корреляции с персистенцией ОИЛ.

[001013] Обновленные данные для группы 2 (n=17 пациентов) представлены на Фигурах 116-121. В сравнении с группой 1 и вариантом осуществления способа Gen 1, для которой были определены ЧКЗ 64% и частота общего ответа (ЧОО) 29% (N=14), для группы 2, и варианта осуществления способа Gen 2, были определены ЧКЗ 80% и ЧОО 40% (N=10).

Заключение

[001014] Предварительные результаты на основании полученных данных показывают сопоставимые уровни безопасности при использовании препаратов ОИЛ LN-144, полученных способами Gen 1 и Gen 2. Введение ОИЛ, полученных способом Gen 2 (способ 2А, описанный в настоящем документе), приводит к удивительно высоким

клиническим ответам у пациентов с метастатической меланомой на поздних стадиях заболевания, которое во всех случаях прогрессировало после предшествующей терапии с использованием анти-PD-1 и анти-CTLA-4. Показатель ЧКЗ для группы 2 составлял 78%.

[001015] Предварительные данные по биомаркерам свидетельствуют в пользу цитолитического механизма действия, предполагаемого для ОИЛ-терапии.

[001016] Вариант осуществления способа производства Gen 2, описанного в настоящем документе, занимает 22 дня. Данный способ позволяет значительно сократить время, в течение которого пациент должен ожидать получения своих ОИЛ, допускает гибкость в схеме дозирования пациентов и ведет к сокращению производственных затрат, при этом обладая другими преимуществами перед предыдущими подходами, которые способствуют коммерциализации и регистрации в регулирующих органах здравоохранения. Предварительные клинические данные по лечению метастатической меланомы с использованием варианта осуществления способа производства Gen 2 также свидетельствуют о неожиданном повышении клинической эффективности ОИЛ, измеренной на основании ЧКЗ, ЧОО и других клинических ответов, с аналогичным временем до развития ответа и профилем безопасности в сравнении с использованием ОИЛ, произведенных с использованием способа Gen 1. Неожиданно повышенная эффективность препарата ОИЛ, полученного способом Gen 2, также продемонстрирована на основании более чем пятикратного увеличения продуцирования IFN-γ (Фигура 98), что, как правило, коррелирует с повышением эффективности (Фигура 122), значительно повышенной поликлональности (Фигура 99A и Фигура 99B) и более высокого среднего продуцирования IP-10 и MCP-1 (Фигуры 123-126). Удивительно, но, несмотря на меньшую продолжительность способа Gen 2, многие другие важные характеристики препарата ОИЛ аналогичны тем, которые наблюдаются при использовании более традиционных способов производства, в том числе относительная длина теломер (Фигура 97), а также экспрессия CD27 и CD28 (Фигура 96B и Фигура 96C).

Литература

[001017] [1]Goff, et al. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. J Clin Oncol. 2016 Jul 10;34(20):2389-97.

[001018] [2]Sarnaik A, Kluger H, Chesney J, et al. Efficacy of single administration of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) in heavily pretreated patients with metastatic melanoma following checkpoint therapy. J Clin Oncol. 2017; 35 [suppl; abstr 3045].

ПРИМЕР 29: Исследования фазы 2 с участием пациентов с ПКГШ и карциномой шейки матки

[001019] Включение в исследование фазы 2 для ПКГШ (плоскоклеточная карцинома головы и шеи; C-145-03). 13 пациентов дали согласие на участие в исследовании, ОИЛ были собраны от 10 пациентов и, в итоге, 7 пациентов получили инфузию и еще для 1 процесс продолжается.

[001020] Включение в исследование фазы 2 для карциномы шейки матки (C-145-

04). 8 пациентов дали согласие на участие в исследовании, ОИЛ были собраны от 4 пациентов и, в итоге, 2 пациента получили инфузию и еще для 2 процесс продолжается.

[001021] Первичные данные текущего исследования представлены на Фигуре 127. Ответ в виде стабильного заболевания (CSD) и/или прогрессирования наблюдали как у пациентов с ПКГШ, так и у пациентов с раком шейки матки, получавших лечение ОИЛ, через 84 дня.

ПРИМЕР 30: Получение криоконсервированных терапевтических клеток ОИЛ

[001022] В данном примере 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.

[001023] 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.

4.0 Эталонный план размножения клеток в способе

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	$5–200\times10^6$ 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

4.2 Объем флаконов

Тип флаконов	**Рабочий объем/флакон (мл)**

G-REX 100MCS	1000
G-REX 500MCS	5000

4.3 Процедура инспекции

4.3.1 Производственный персонал будет выполнять 100% проверку упаковок конечного препарата в процессе фасовки.

4.3.2 Готовят контейнер, маркированный «инспекция для выявления некачественного конечного препарата».

4.3.3 Инспектируют на следующие атрибуты, являющиеся основанием для выбраковки:

4.3.3.1 Крупные видимые частицы (волокна, частицы иного цвета, чем суспензия, и так далее) (ПРИМЕЧАНИЕ: клеточные/тканевые агломераты не следует считать подлежащими выбраковке частицами).

4.3.3.2 Нарушения целостности мешка, например протекающие швы/порты.

4.3.3.3 Неполное запечатывание внешней обертки мешка.

4.3.3.4 Протекающие сварные швы.

4.3.3.5 Признаки наличия комков.

4.3.4 Инспектируют на следующие приемлемые внешние атрибуты:

4.3.4.1 Неповрежденный мешок

4.3.4.2 Отсутствие комков

4.3.5 В случае отсутствия атрибутов, являющихся основанием для выбраковки, возвращают мешок с конечным препаратом в партию.

4.3.6 Если замечены какие-либо атрибуты, являющиеся основанием для выбраковки, маркируют мешок этикеткой «бракованный препарат», помещают мешок в контейнер для хранения «бракованных препаратов».

4.4 Схема технологического процесса (смотри Фигуру 128)

5.0 ПРИМЕЧАНИЯ К ПРОЦЕССУ

5.1 Распечатки, содержащие окончательные отчетные данные, должны быть прикреплены к данной документации на партию в специально отведенном месте. В каждой распечатке должно быть указано: номер лота, номер этапа (если применимо), а также инициалы сотрудника и дата. Если невозможно получить распечатки, результаты должны быть записаны вручную, вместо распечатки, и со ссылкой на комментарий в разделе комментариев. Второй сотрудник должен проверить данные.

5.2 Этапы процесса можно выполнять параллельно при получении материалов, во время подготовки, во время действий после завершения процесса, или как отмечено в описании процесса.

5.3 В документации на партию считают, что 1,0 мл/л=1,0 г/кг, если не указано иначе.

5.4 Если критический материал/расходный материал должен быть заменен в разделе 7.1, должен быть записан соответствующий комментарий в разделе 10.0 и должны

быть извещены соответствующие лица.

5.5 В документации на партию округляют все данные до ближайшего десятичного знака после запятой (xx,x) или в пределах допустимой погрешности для используемого оборудования (за исключением распечатанных данных), если нет иных указаний.

5.6 Если для оборудования требуется калибровка более одного параметра, и эти даты калибровки отличаются, будет записана самая ранняя дата выполнения.

5.7 Все результаты измерения CO_2, записанные в документации на данную партию, будут получены на CO_2-анализаторе Vaisala в League Island 1. Все результаты измерения CO_2, записанные в документации на данную партию, будут считаны с LED дисплея в Commerce Center 3.

5.8 Все инкубаторы для League Island 1 будут иметь увлажненную атмосферу. Все инкубаторы для Commerce Center 3 будут без увлажнения.

5.9 После открытия емкостей применимы следующие сроки годности при 2-8°C: человеческая сыворотка, тип AB (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.

5.10 Номер расписки и номер лота в Great Plains будут записаны в разделе 7.1 Критические материалы/Расходные материалы в случае, если номер лота WuXi AppTec не присвоен материалу(ам). Сочетание номера расписки и номера лота заменит номер лота WuXi AppTec для новых материалов, закупленных в дальнейшем, в рамках реализации и валидации системы Great Plains.

5.11 При использовании сварочного аппарата TSCD для соединений следуют инструкциям, напечатанным на передней части аппарата. Следует убедиться, что трубки вставлены правильно, как указано на аппарате. При загрузке трубки следует убедиться, что трубка вставлена так, чтобы предыдущий сварной шов не попал под зажимы сварочного аппарата (где это возможно). Кроме того, следует убедиться, что осталась достаточная длина трубки для этапов, следующих за сваркой. Кровоостанавливающий зажим следует размещать по обе стороны трубки перед началом процесса сварки. После окончания сварки проверяют сварочный шов, чтобы убедиться, что он герметичен и однороден вокруг трубки. Сжимают или пропускают между пальцами соединение, чтобы открыть сварной шов, затем снимают кровоостанавливающие зажимы.

5.12 Каждый день перед использованием ручного сварочного аппарата для трубок SEBRA® очищают и осматривают уплотнительную головку, чтобы убедиться в надлежащем функционировании. Затем, используя ручной сварочной аппарат для трубок SEBRA® для разделения трубки, создают три сварных шва в непосредственной близости друг от друга. Убеждаются, что внешняя часть трубки сухая, чтобы предотвратить электрическую дугу. Разделяют или разъединяют трубку, разрезая средний сварной шов, если не указано иначе. Не применяют противоположно направленные силы к трубке для

предотвращения преждевременного разделения трубки во время сварки. Не следует пытаться снова заварить сварной шов, если первая попытка была неудачной. При необходимости выполняют «пробные сварные швы», используя ручной сварочный аппарат, и по мере необходимости оценивают ручной сварочный аппарат.

5.13 Тщательно проверяют все зажимы и кровоостанавливающие зажимы на недостатки или повреждения, которые могут препятствовать своевременной остановке потока или потенциально повреждать трубку.

5.14 Если появляется сообщение Nucelocounter, показывающее значение, которое на 1 и/или 2 выше оптимального диапазона количеств (5×10^4–5×10^6 до учета разбавления), Н/П остальная часть страницы подсчета клеток. Готовят другой образец суспензии клеток, разбавляют с соответствующим коэффициентом разведения ([новый коэффициент разведения]=[прежний коэффициент разведения]х[сообщенное количество клеток]÷[5×10^5]) для получения количества ЖСК или «живых клеток» в оптимальном диапазоне. Если количество клеток составляет на 1 и/или 2 ниже оптимального диапазона (слишком большое разведение), сообщают территориальному менеджменту, записывают количество «живых клеток» и продолжают расчеты. В любом случае обязательно документируют количество клеток, выходящее за пределы оптимального диапазона, в примечании.

5.15 При записи информации о получении опухоли проверяют, чтобы время удаления опухоли у пациента было переведено в восточное стандартное время (EST), если это уже не выполнено и не записано в таком виде в документации, относящейся к транспортировке опухоли. Время, прошедшее от удаления опухоли у пациента до получения опухоли в лаборатории, должно быть рассчитано в EST.

5.16 Во время сбора клеток в день 22 можно использовать два Gatherex™ для сбора ОИЛ из флаконов G-Rex 500MCS. Оба можно использовать для удаления супернатанта, и один из двух использовать для сбора ОИЛ.

5.17 Во время всех этапов обработки минимальное количество персонала, допустимое в комнате обработки категории В, - два, а максимальное количество - десять (включая персонал, занимающийся анализом окружающей среды).

5.18 При разделении на аликвоты реагентов среды в объемах ≤1,0 мл промывают пипетку после разлива.

5.19 Флаконы будут повторно инкубироваться во время нагревания среды и в любом другом случае, когда с ними активно не работают. Этапы инкубации будут записаны только в начале и в конце каждого раздела, если применимо. В дни незапланированной обработки флаконы можно осматривать только для целей информации, согласно указаниям территориального менеджмента или клиента, без проведения санитарной обработки помещения или мониторинга оборудования.

5.20 После завершения обработки в день 0, измельчения опухоли, высевания клеток и инкубации флаконов, все оставшиеся фрагменты и куски опухоли следует соответствующим образом утилизировать.

6.0 ОБОРУДОВАНИЕ

[001024] Список оборудования: День 0 Приготовление среды CM1/промывание опухоли/измельчение опухоли:

- воздушный дифференциальный манометр
- бокс биологической безопасности (ББББ)
- инкубатор
- анализатор CO_2
- микропипетка (100-1000 мкл)
- пипеточный дозатор
- перистальтический насос Ваха
- сварочный аппарат Sebra
- холодильник с температурой 2-8°C
- морозильная камера с температурой -80°C
- морозильная камера с температурой -20°C
- таймер

[001025] Список оборудования: Приготовление CM2/день 11 высевание для ПБР

- воздушный дифференциальный манометр
- бокс биологической безопасности (ББББ)
- инкубатор
- инкубатор
- анализатор CO_2
- сухая баня
- водяная баня
- CytoTherm
- сварочный аппарат
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- перистальтический насос Ваха
- сварочный аппарат Sebra
- весы

[001026] Список оборудования: Приготовление CM2/день 11 высевание для ПБР

- центрифуга
- микропипетка (100-1000 мкл)
- пипеточный дозатор
- таймер
- холодильник с температурой 2-8°C
- морозильная камера с температурой -80°C
- морозильная камера с регулируемой скоростью заморозки
- морозильная камера для хранения в LN_2 (Quarantine)
- морозильная камера с температурой -20°C

[001027] Список оборудования: Приготовление СМ4/день 16

- воздушный дифференциальный манометр
- бокс биологической безопасности (ББББ)
- инкубатор
- инкубатор
- анализатор CO_2
- сварочный аппарат
- сварочный аппарат
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- перистальтический насос Baxa
- сварочный аппарат Sebra
- весы
- микропипетка (100-1000 мкл)
- пипеточный дозатор
- холодильник с температурой 2-8°C
- морозильная камера с температурой -80°C

[001028] Список оборудования: День 22 Формулирование, фасовка, криоконсервирование

- воздушный дифференциальный манометр
- бокс биологической безопасности (ББББ)
- инкубатор
- инкубатор
- анализатор CO_2
- сварочный аппарат
- Gatherex
- NC200 NucleoCounter
- перистальтический насос Baxa
- сварочный аппарат Sebra
- весы
- микропипетка (20-200 мкл)
- пипеточный дозатор

[001029] Список оборудования: День 22 Формулирование, фасовка, криоконсервирование

- пипеточный дозатор
- холодильник с температурой 2-8°C
- морозильная камера с температурой -80°C
- морозильная камера с регулируемой скоростью заморозки
- морозильная камера для хранения в LN_2
- морозильная камера для хранения в LN_2 (Quarantine)

- система обработки клеток LOVO

7.0 СПИСОК МАТЕРИАЛОВ

[001030] Материалы: День 0 Приготовление среды CM1/промывание опухоли/измельчение опухоли:

[001031] Измельчение

- скальпели одноразовые, стерильные
- 50-мл серологические пипетки, стерильные
- 1-мл серологическая пластиковая пипетка, стерильная
- 10-мл серологическая пипетка, стерильная
- центрифужная пробирка, 50-мл, 28×114 мм, коническое основание, завинчивающаяся крышка, PP, стерильная
- 25-мл серологическая пипетка, стерильная
- 5-мл серологическая пипетка, стерильная
- серии MF75, одноразовый фильтр для культуры тканей, 1000-мл, aPES фильтр, 0,2-мкм, стерильный
- пипетки, серологические 100-мл
- 2-меркаптоэтанол 1000X, жидкий, 55 мМ в D-PBS
- сбалансированный солевой раствор Хэнка (1X), жидкий, без хлорида кальция, хлорида магния, сульфата магния
- GlutaMAX 1-200 мМ (100X), жидкий
- ART барьерные наконечники для пипеток, 1000-мкл, в индивидуальной упаковке, стерильные
- 150-мм чашка Петри, экстра-глубокая, стерильная
- 6-луночные, сверхслабо адгезионные планшеты, площадь лунки для роста 9,5-см^2, PS, стерильные
- пипетки для переноса общего назначения Thermo Scientific Samco, 7,7-мл, стерильные
- набор для перекачивания жидкости с насосом, с конусом Люэра на конце
- длинный пинцет 8", стерильный
- гентамицин сульфат, маточный раствор 50 мг/мл
- медицинский одноразовый пинцет, 4,5", нержавеющая сталь, стерильный
- 100-мм чашка Петри, стерильная, экстра-глубокая
- система дозирования жидкости Pumpmatic™
- гентамицин сульфат, маточный раствор 50 мг/мл
- колпачок для шприца двойного назначения, красный
- RPMI-1640, 1-л флакон
- закрытая система флакона G-Rex 100M
- стерильные линейки
- восстановленный IL-2
- образец человеческой опухоли, головы и шеи □ Н/П

- образец человеческой опухоли, шейки матки □ Н/П

- GemCell человеческая АВ сыворотка, инактивированная нагреванием □ Н/П

- образец человеческой опухоли, меланома

- GemCell человеческая АВ сыворотка, инактивированная нагреванием

[001032] Материалы: Приготовление CM2/день 11 высевание для ПБР

- шприц с креплением Люэра, 60-мл, стерильный, игла 16G x 1,5", стерильная

- 50-мл серологические пипетки, стерильные

- 1-мл серологическая пластиковая пипетка, стерильная

- криопробирки Nunc с внутренней резьбой, стерильные

- 10-мл серологическая пипетка, стерильная

- центрифужная пробирка, 15-мл

- центрифужная пробирка, 50-мл

- пипетки, серологические 100-мл

- шприц, 1-см^3, стерильный с креплением Люэра

- 3-мл шприц, с креплением Люэра на конце, стерильный

- 5-мл серологическая пипетка, стерильная

- Nalgene *MF75* серии приемный резервуар фильтровальной ячейки, 250-мл, стерильный

- Nalgene MF75 серии приемный резервуар фильтровальной ячейки, 5000-мл, стерильный

- 1000-мл Nalgene Rapid-Flow стерильная одноразовая фильтровальная ячейка, 0,22-мкм, PES

- CryoStor CS-10

- 2-меркаптоэтанол 1000X, жидкий, 55 мМ в D-PBS

- GlutaMAX 1-200 мМ (100X), жидкий

- 1000-мкл ART барьерные стерильные наконечники для пипеток, в индивидуальной упаковке

- кассеты VIA1

- контейнер - пакет для переноса, 1000 мл с соединительной муфтой, стерильный

- пакет для переноса 300 мл с соединительной муфтой

- стерильные спиртовые тампоны

- набор для перекачивания жидкости с насосом, с конусом Люэра на конце

- CTS AIM V 1-л флакон

- MACS GMP CD3 чистый (OKT-3)

- гентамицин сульфат, маточный раствор 50 мг/мл

- 4" трубка с пирсинговым штифтом и адаптером шприца

- шприц только с креплением Люэра, 10-мл

- трубки, разветвленный трубопровод с четырьмя иглами с конусами Люэра

- набор для гравитационного вливания крови Y-типа без инъекционного поля, 170-мкм фильтр для крови

- система дозирования жидкости Pumpmatic™
- 10-л мешок Labtainer™ с 3 портами
- гентамицин сульфат, маточный раствор 50 мг/мл
- 100-мл шприц
- 3000-мл мешок для культивирования
- Origen Cell Connect CC2
- колпачок для шприца двойного назначения, красный
- RPMI-1640, 1-л флакон
- закрытая система флакона G-Rex 500M
- восстановленный IL-2
- аллогенные облученные питающие клетки
- аллогенные облученные питающие клетки
- человеческая сыворотка, типа AB(HI), Gemini
- человеческая сыворотка, типа AB(HI), Gemini

[001033] Материалы: Приготовление CM4/день 16

- шприц с креплением Люэра, 60-мл, стерильный
- 1-мл серологическая пластиковая пипетка, стерильная
- криопробирки Nunc с внутренней резьбой, стерильные
- 10-мл серологические пипетки, стерильные
- центрифужная пробирка, 15-мл
- центрифужная пробирка, 50-мл
- пипетки, серологические 100-мл
- шприц с креплением Люэра, стерильный, 3-мл
- 5-мл серологическая пипетка, стерильная
- шприц только с креплением Люэра, 10-мл
- Nalgene *MF75* серии приемный резервуар фильтровальной ячейки, 250-мл, стерильный
- GlutaMAX1 200 мМ (100X), жидкий
- ART барьерные наконечники для пипеток, 1000-мкл, в индивидуальной упаковке, стерильные
- VIA1 кассеты

[001034] Материалы: CM4 Приготовление CM4/день 16

- контейнер - пакет для переноса, 1000 мл с соединительной муфтой, стерильный
- стерильные спиртовые тампоны
- набор для перекачивания жидкости с насосом, с конусом Люэра на конце
- CTS AIM-V 1000 мл □ Н/П
- набор для переливания плазмы, 4” трубки с канюлей Люэра
- 30-мл стерильный шприц с креплением Люэра
- CTS AIM V 10-л мешок
- система дозирования жидкости Pumpmatic™

- 10-л мешок Labtainer™ с 3 портами
- колпачок для шприца двойного назначения, красный
- закрытая система флакона G-Rex500M
- восстановленный IL-2

[001035] Материалы: День 22 Формулирование, фасовка, криоконсервирование

- шприц с креплением Люэра, 60-мл, стерильный
- игла 16G x 1,5”, стерильная
- 50-мл серологические пипетки, стерильные
- криопробирки Nunc с внутренней резьбой, стерильные
- 10-мл серологическая пипетка, стерильная
- центрифужная пробирка, 15-мл
- центрифужная пробирка, 50-мл
- шприц, 1-см^3, стерильный с креплением Люэра
- 3-мл шприц, с креплением Люэра на конце, стерильный
- 25-мл серологическая пипетка, стерильная
- 5-мл серологическая пипетка, стерильная
- шприц только с креплением Люэра, 10-мл
- пипетки, серологические 100-мл
- ART барьерные наконечники для пипеток, 200-мкл, в индивидуальной упаковке
- VIA1 кассеты
- Plasma-Lyte A инъекционный 1 л
- одноразовый набор для промывания клеток LOVO
- набор вспомогательных мешков LOVO
- стерильные спиртовые тампоны
- набор для перекачивания жидкости с насосом, с конусом Люэра на конце
- CTS AIM V 1-л флакон
- человеческий альбумин, 25%
- набор для переливания плазмы, 4” трубки с канюлей Люэра
- трубки, разветвленный трубопровод с четырьмя иглами с конусами Люэра
- набор для гравитационного вливания крови Y-типа без инъекционного поля, 170-мкм фильтр для крови
- система дозирования жидкости Pumpmatic™
- 10-л мешок Labtainer™ с 3 портами
- 100-мл шприц
- криомешок CS750
- 3-л мешок для культивирования
- Origen Cell Connect CC2
- колпачок для шприца двойного назначения, красный
- Cryostor CS10, 100-мл мешок
- Дозирующая игла, вентилируемая

- восстановленный IL-2.

8.0 Процесс

[001036] ОПИСАНИЕ ЭТАПА; ОСНОВНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ПРОЦЕССЕ

8.1 День 0, Приготовление среды CM1

8.1.1 Проверяют санитарную обработку помещения, чистоту линий и материалы. Подтверждают санитарную обработку помещения.

8.1.2 Убеждаются в заполнении предпроцессорной таблицы.

8.1.3 Мониторинг окружающей среды. Перед обработкой убеждаются, что начат мониторинг окружающей среды перед проведением обработки.

8.1.4 Готовят среду RPMI 1640. В БББ, используя пипетку соответствующего размера, отбирают 100,0 мл из 1000 мл среды RPMI 1640 и помещают в контейнер соответствующего размера, маркированный «отходы».

8.1.5 В БББ добавляют реагенты во флакон со средой RPMI 1640. Во флакон со средой RPMI 1640 добавляют следующие реагенты, приведенные в Таблице. Записывают добавленные объемы.

Добавленное количество на флакон: инактивированная нагреванием человеческая AB сыворотка (100,0 мл); GlutaMax (10,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл); 2-меркаптоэтанол (1,0 мл).

8.1.6 Перемешивают среду. Закрывают крышкой флакон со средой RPMI 1640 из этапа 8.1.5 и вращают флакон для гарантии тщательного перемешивания реагентов.

8.1.7 Фильтруют среду RPMI 1640 из этапа 8.1.6 через 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон.

8.1.8 Маркируют фильтрованную среду. Асептически закрывают фильтрованную среду, и на этикетке указывают следующую информацию.

8.1.9 Удаляют ненужные материалы из БББ. Выносят реагенты для среды из БББ, оставляют гентамицин сульфат и HBSS в БББ для приготовления сформулированной промывающей среды, описанной в разделе 8.2.

8.1.10 Хранят неиспользованные расходные материалы. Переносят любые оставшиеся открытые/размороженные реагенты для среды в соответствующие условия хранения или помещают в отходы.

ПРИМЕЧАНИЕ: присваивают соответствующий срок хранения открытым реагентам для среды в соответствии с примечанием к процессу 5.9 и маркируют номером лота из документации на партию.

8.1.11 Размораживают аликвоту IL-2. Размораживают одну 1,1-мл аликвоту IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) до полного таяния льда. Записывают для IL-2: № лота и срок годности. (ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются, что этикетка для IL-2 прикреплена).

8.1.12 Переносят маточный раствор IL-2 в среду. В БББ переносят 1,0 мл маточного раствора IL-2 во флакон со средой CM1, день 0, приготовленной на этапе 8.1.8. Объединяют 1 флакон среды CM1, день 0, и 1,0 мл IL-2 (6×10^6 МЕ/мл).

8.1.13 Перемешивают и меняют этикетку. Закрывают и вращают флакон для

перемешивания среды, содержащей IL-2. Заново маркируют надписью «полная среда CM1, день 0» и присваивают новый номер лота.

8.1.14 Отбирают образец среды в соответствии с планом сбора образцов. Используя пипетку соответствующего размера, отбирают 20,0 мл среды и вносят в 50-мл коническую пробирку.

8.1.15 Маркируют и хранят. Образец маркируют этикеткой в соответствии с планом сбора образцов и хранят «архивный образец среды» при 2-8°C до передачи на тестирование в соответствии с планом тестирования образцов.

8.1.16 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.1.17 Готовят коническую пробирку «куски ткани». В БББ переносят 25,0 мл «полной среды CM1, день 0» (приготовленной на этапе 8.1.13) в 50-мл коническую пробирку. Маркируют пробирку надписью «куски ткани» и номером лота из документации на партию.

8.1.18 Переносят G-REX 100MCS в БББ. Асептически переносят G-REX 100MCS (W3013130) в БББ.

8.1.19 Готовят G-REX 100MCS. В БББ закрывают все зажимы на G-REX 100MCS, оставляя зажим вентиляционного фильтра открытым.

8.1.20 Готовят G-REX 100MCS. Соединяют красную линию флакона G-REX 100MCS с большего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом (W3009497) через крепление Люэра.

8.1.21 Готовят насос Ваха. Помещают насос Ваха рядом с БББ. Извлекают секцию трубки насоса из набора для перекачивания жидкости с насосом из БББ и устанавливают в перистальтический насос.

8.1.22 Готовятся к перекачиванию среды. В БББ извлекают шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) (W3012720) и выбрасывают.

ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются в сохранении стерильности пипетки PLDS.

8.1.23 Готовятся к перекачиванию среды. Соединяют пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра и помещают наконечник пипетки в «полную среду CM1, день 0» (приготовленную на этапе 8.1.13) для аспирации.

Открывают все зажимы между средой и G-REX 100MCS.

8.1.24 Закачивают полную среду CM1 во флакон G-REX 100MCS. Устанавливают скорость насоса на отметку «высокая» и «9», и закачивают всю полную среду CM1, день 0, во флакон G-REX 100MCS. После переноса всей среды очищают линию и останавливают насос.

8.1.25 Отсоединяют насос от флакона. Убеждаются, что все зажимы на флаконе закрыты, кроме вентиляционного фильтра. Отделяют набор для перекачивания жидкости с насосом от красной линии для среды, и надевают красный колпачок (W3012845) на красную линию для среды.

8.1.26 Производят сварку. Извлекают флакон G-REX 100MCS из БББ, отделяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красный колпачок от красной линии рядом с креплением Люэра.

8.1.27 Маркируют G-REX 100MCS. Маркируют флакон G-REX 100MCS предоставленной отделом ОК относящейся к процессу этикеткой «День 0». Образец этикетки «День 0» приведен ниже.

8.1.28 Контролируют инкубатор. Параметры инкубатора: Температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C; процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.1.29 Нагревают среду. Помещают 50-мл коническую пробирку, маркированную «куски ткани», приготовленную на этапе 8.1.17, и G-Rex 100MCS, приготовленный на этапе 8.1.27, на ≥30 минут для нагревания.

Записывают время нагревания ниже. Записывают, если время нагревания составляло ≥30 минут (Да/Нет).

[Коническая пробирка «куски ткани» или GRex100MCS]

8.1.30 Анализируют раздел 8.1.

8.2 День 0, Приготовление среды для промывания опухоли

8.2.1 Добавляют гентамицин в HBSS. В БББ добавляют 5,0 мл гентамицина (W3009832 или W3012735) в 1×500 мл флакон со средой HBSS (W3013128). Записывают объемы. Добавляют на флакон: HBSS (500,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (5,0 мл).

8.2.2 Закрывают крышкой флакон с HBSS и вращают. Закрывают крышкой флакон с HBSS, содержащим гентамицин, полученным на этапе 8.2.1, и вращают флакон для обеспечения тщательного перемешивания реагентов.

8.2.3 Фильтруют раствор. Фильтруют HBSS, содержащий гентамицин, полученный на этапе 8.2.1, через 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон (W1218810).

8.2.4 Асептически закрывают фильтрованную среду и маркируют. Асептически закрывают фильтрованную среду и на этикетке указывают следующую информацию. Переходят к разделу 8.3.

8.2.5 Анализируют раздел 8.2.

8.3 День 0, Обработка опухоли

8.3.1 Получают опухоль. Получают образец опухоли от ПКК и немедленно переносят в комнату с температурой 2-8°C для обработки. Убеждаются, что вся необходимая информация внесена в документацию, относящуюся к транспортировке опухоли.

8.3.2 Записывают информацию об опухоли.

8.3.3 Прикрепляют этикетку для опухоли. Прикрепляют этикетку для опухоли к контейнеру. ПКК выпускает этикетку, приведенную ниже. Прикрепляют документацию на партию, относящуюся к опухоли, в виде №5.

8.3.4 Переносят материалы, необходимые для измельчения опухоли, в БББ.

8.3.5 Открывают материалы. Открывают материалы внутри БББ, обеспечивая поддержание стерильности материалов.

8.3.6 Маркируют материалы. Маркируют три 50-мл конические пробирки: первую «пинцет», вторую «скальпель» и третью «свежая среда для промывания опухоли». Маркируют 5×100-мм чашек Петри: «промывание 1», «промывание 2», «промывание 3», «хранение» и «неподходящие». Маркируют один 6-луночный планшет «подходящие промежуточные фрагменты».

8.3.7 Разделяют на аликвоты среду для промывания опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 5,0 мл «среды для промывания опухоли», приготовленной на этапе 8.2.4, в каждую лунку одного 6-луночного планшета для подходящих промежуточных фрагментов опухоли (всего 30,0 мл). ПРИМЕЧАНИЕ: пинцет и скальпель хранят в их соответствующих конических пробирках со средой для промывания опухоли, по мере необходимости, в процессе промывания и измельчения опухоли.

8.3.8 Разделяют на аликвоты среду для промывания опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 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).

8.3.9 Разделяют на аликвоты среду для промывания опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 20,0 мл «среды для промывания опухоли», приготовленной на этапе 8.2.4, в каждую 50-мл коническую пробирку (всего 60,0 мл).

8.3.10 Готовят крышки для кусков опухоли. Асептически снимают крышки с двух 6-луночных планшетов. Крышки используют для выбранных кусков опухоли. ПРИМЕЧАНИЕ: на всем протяжении обработки опухоли НЕ используют перекрестно открытые планшеты для культивирования тканей и крышки.

8.3.11 Переносят опухоль в ББВ. Асептически переносят опухоль в ББВ. Записывают время начала обработки.

8.3.12 Промывание опухоли 1: используя 8” пинцет (W3009771), извлекают опухоль из флакона для образцов и переносят в чашку «промывание 1», приготовленную на этапе 8.3.8.

ПРИМЕЧАНИЕ: сохраняют раствор во флаконе для образцов.

8.3.13 Промывание опухоли 1: Используя пинцет, осторожно промывают опухоль и записывают время с таймера: образец оставляют на период времени ≥3 минут. Записывают время промывания (ММ:СС).

8.3.14 Готовят образец биомассы в соответствии с планом сбора образцов. Переносят 20,0 мл (или доступный объем) раствора из флакона с образцом опухоли в 50-мл коническую пробирку в соответствии с планом сбора образцов.

8.3.15 Маркируют и хранят образец. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят образец биомассы, собранный на этапе 8.3.14, при 2-8°С до передачи на тестирование.

8.3.16 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.3.17 Промывание опухоли 2. Используя новые пинцеты, извлекают опухоль из чашки «промывание 1» и переносят в чашку «промывание 2», приготовленную на этапе 8.3.8.

8.3.18 Промывание опухоли 2. Используя пинцет, промывают образец опухоли, осторожно покачивая в течение ≥3 минут, и дают возможность оседать. Записывают время.

8.3.19 Наносят капли среды для промывания опухоли для нужных фрагментов опухоли. Используя пипетку для переноса, помещают 4 отдельные капли среды для промывания опухоли из конической пробирки, приготовленной на этапе 8.3.9, в каждый из 6 кружков на перевернутых крышках 6-луночных планшетов (2 крышки). Помещают дополнительную каплю на два кружка, всего 50 капель.

8.3.20 Промывание опухоли 3. Используя пинцет, извлекают опухоль из чашки «промывание 2» и переносят в чашку «промывание 3», приготовленную на этапе 8.3.8.

8.3.21 Промывание опухоли 3. Используя пинцет, промывают образец опухоли, осторожно покачивая и давая возможность оседать, в течение ≥3 минут. Записывают время.

8.3.22 Готовят чашку для измельчения опухоли. Помещают линейку под крышку 150-мм чашки.

8.3.23 Переносят опухоль в чашку для измельчения. Используя пинцет, асептически переносят образец опухоли в крышку 150-мм чашки для измельчения.

8.3.24 Измеряют опухоль. Собирают все куски образца опухоли, соединяя концы с концами, и записывают примерную общую длину и количество фрагментов. Получают четкую фотографию каждого образца опухоли.

8.3.25 Оценивают опухоль. Оценивают опухоль на наличие некротической/жировой ткани. Оценивают, является ли >30% всей площади опухоли некротической и/или жировой тканью; если да, связываются с территориальным менеджментом, чтобы убедиться, что опухоль имеет подходящий размер, затем переходят к этапу 8.3.26. Оценивают, является ли <30% всей площади опухоли некротической и/или жировой тканью; если да, переходят к этапу 8.3.27, и очистительную обрезку НЕ проводят.

8.3.26 Если применимо: Очистительная обрезка. Если опухоль большая, и >30% внешней поверхности опухоли выглядят как некротическая/жировая ткань, проводят «очистительную обрезку» путем удаления некротической/жировой ткани, сохраняя при этом внутреннюю структуру опухоли, с использованием сочетания скальпеля и/или пинцета. ПРИМЕЧАНИЕ: для сохранения внутренней структуры опухоли используют только вертикальное давление при разрезании. Не производят пилящие движения скальпелем. ПРИМЕЧАНИЕ: жир, некротическую и периферическую ткань помещают в чашку для неподходящей ткани.

8.3.27 Измельчают опухоль. Используя сочетание скальпеля и/или пинцета, нарезают образец опухоли на равные фрагменты соответствующего размера (вплоть до 6

промежуточных фрагментов). ПРИМЕЧАНИЕ: для сохранения внутренней структуры опухоли используют только вертикальное давление при разрезании. Не производят пилящие движения скальпелем. ПРИМЕЧАНИЕ: следят за тем, чтобы не разрезаемые промежуточные фрагменты были полностью погружены в «среду для промывания опухоли» (приготовленную на этапе 8.2.4).

8.3.28 Переносят промежуточные фрагменты опухоли. Переносят каждый промежуточный фрагмент в чашку, маркированную «хранение», приготовленную на этапе 8.3.8.

8.3.29 Нарезают фрагменты опухоли. Работая каждый раз с одним промежуточным фрагментом, нарезают промежуточный фрагмент опухоли в чашке для измельчения на куски размером примерно 3×3x3 мм, оставляя минимальное количество геморрагической, некротической и/или жировой ткани на каждом куске. ПРИМЕЧАНИЕ: для сохранения внутренней структуры опухоли используют только вертикальное давление при разрезании. Не производят пилящие движения скальпелем.

8.3.30 Выбирают куски опухоли. Выбирают до восьми (8) кусков опухоли без геморрагической, некротической и/или жировой ткани. Используют линейку для справки. Продолжают измельчение до получения 8 подходящих кусков или до полного измельчения промежуточного фрагмента. Переносят каждый выбранный кусок в одну из капель «среды для промывания опухоли», приготовленной на этапе 8.3.19.

8.3.31 Хранят промежуточные фрагменты для предотвращения высыхания. После выбора (8) кусков из промежуточного фрагмента помещают остатки промежуточного фрагмента в новую одиночную лунку 6-луночного планшета «подходящие промежуточные фрагменты», приготовленного на этапе 8.3.7. ПРИМЕЧАНИЕ: Жировую или некротическую ткань помещают в чашку «неподходящая ткань», (приготовленную на этапе 8.3.6).

8.3.32 Продолжают нарезание промежуточных фрагментов. Переходят к следующему промежуточному фрагменту, повторяют этапы 8.3.29-8.3.31 до завершения обработки всех промежуточных фрагментов, используют свежие скальпели и пинцеты по мере необходимости.

8.3.33 Определяют количество собранных кусков. Если остается подходящая ткань, выбирают дополнительные подходящие куски опухоли из 6-луночного планшета «подходящие промежуточные фрагменты», заполняя капли для, максимум, 50 кусков. Записывают общее количество полученных измельченных кусков. ПРИМЕЧАНИЕ: следят за тем, чтобы промежуточные фрагменты опухоли оставались увлажненными средой для промывания на всем протяжении измельчения ткани. Записывают общее количество полученных измельченных кусков.

8.3.34 Извлекают коническую пробирку из инкубатора. Извлекают 50-мл коническую пробирку «куски ткани» из инкубатора. Записывают время на этапе 8.1.29. Следят, чтобы коническая пробирка нагревалась в течение ≥30 мин.

8.3.35 Готовят коническую пробирку. Переносят 50-мл коническую пробирку

«куски ткани» в БББ, принимая меры для сохранения стерильности открытых поверхностей для обработки.

8.3.36 Переносят куски опухоли в 50-мл коническую пробирку. Используя пипетку для переноса, скальпель, пинцет или их сочетание, переносят выбранные 50 лучших фрагментов опухоли из крышек чашек для подходящих фрагментов в 50-мл коническую пробирку «куски ткани». ПРИМЕЧАНИЕ: если кусок опухоли падает при переносе и остается подходящая ткань, добавляют дополнительные куски из лунок с подходящими промежуточными фрагментами опухоли. Записывают количество кусков.

8.3.37 Готовят ББВ для G-REX 100MCS. Удаляют все ненужные материалы из ББВ для засевания емкости, оставляя чашки для подходящей ткани, если они содержат дополнительные фрагменты.

8.3.38 Извлекают G-REX 100MCS из инкубатора. Извлекают из инкубатора G-REX 100MCS со средой. Завершают этап 8.1.29.

8.3.39 Переносят флакон в ББВ. Асептически переносят флакон G-REX 100MCS в ББВ. ПРИМЕЧАНИЕ: при переносе флакона не держат его со стороны крышки или дна емкости. Переносят флакон, держа его за боковые поверхности. ПРИМЕЧАНИЕ: используют только IPA WIPES при обращении с флаконами G-Rex.

8.3.40 Добавляют фрагменты опухоли во флакон G-REX 100MCS. В ББВ поднимают крышку флакона G-REX 100MCS, следя за сохранением стерильности внутренних трубок. Вращают коническую пробирку с кусками опухоли для суспендирования кусков, и быстро выливают содержимое во флакон G-REX 100MCS.

8.3.41 Равномерно распределяют куски. Убеждаются, что куски опухоли равномерно распределены по всей мембране флакона. Осторожно наклоняют флакон взад-вперед, при необходимости, для гарантии равномерного распределения кусков опухоли.

8.3.42 Записывают общее количество фрагментов опухоли в емкости. Записывают количество опухолевых фрагментов на нижней мембране емкости и количество всплывающих фрагментов в емкости. ПРИМЕЧАНИЕ: если количество высеянных фрагментов НЕ соответствует количеству собранных фрагментов, сообщают территориальному менеджменту и документируют этот факт в разделе 10.0.

8.3.43 Инкубируют флакон G-Rex. Инкубируют G-REX 100MCS в следующих условиях: инкубируемый флакон G-Rex: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C; процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.3.44 Рассчитывают окно инкубации. Производят 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.

8.3.45 Мониторинг окружающей среды. После этапа обработки проверяют, чтобы был произведен мониторинг ББВ и персонала.

8.3.46 Утилизируют материалы. Хранят оставшуюся не нагретую среду при 2-8°C и маркируют. После завершения процесса выбрасывают любую оставшуюся нагретую среду

и размораживают аликвоты IL-2.

8.3.47 Передача образцов. Убеждаются, что все образцы, собранные в день 0, переданы в Login и перенесены в LIMS.

8.3.48 Анализируют раздел 8.3.

8.4 День 11 – Приготовление среды

8.4.1 Проверяют санитарную обработку помещения, чистоту линий и материалы. Подтверждают санитарную обработку помещения, чистоту линий и то, что срок годности материалов не истек.

8.4.2 Предпроцессорная таблица. Список оборудования: ББББ; весы; сварочный аппарат для трубок Sebra; Gatherex™ устройство для удаления среды и извлечения клеток; убеждаются, что предоставленная КК табличка помещена в соответствующий ББББ; убеждаются, что на предоставленной КК табличке номер лота и информация о пациенте соответствует номеру лота и информации о пациенте в данной документации на партию.

8.4.3 Контролируют инкубатор. Контролируют инкубатор. Параметры инкубатора: Температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C; процентное содержание CO_2: 5,0±1,5%CO_2. ПРИМЕЧАНИЕ: действия раздела 8.4 можно выполнять параллельно с действиями раздела 8.5.

8.4.4 Нагревают среду. Нагревают 3×1000-мл флакона со средой RPMI 1640 (W3013112) и 3×1000-мл флакона с AIM-V (W3009501) в инкубаторе в течение ≥30 минут. Записывают время. Среда: RPMI 1640 и AIM-V. ПРИМЕЧАНИЕ: оставляют дополнительный 1×1000-мл флакон со средой AIM-V (W3009501) при комнатной температуре для использования на этапе 8.5.34. Маркируют флакон надписью «Только для разведений при подсчета клеток» и номером лота из документации на партию.

8.4.5 Мониторинг окружающей среды. Перед обработкой убеждаются, что предпроцессорный мониторинг окружающей среды был проведен в соответствии с СОП-00344.

8.4.6 Извлекают среду RPMI 1640 из инкубатора. Извлекают среду RPMI 1640 по достижении нужного времени. Записывают время окончания инкубации на этапе 8.4.4. Убеждаются, что среда нагревалась в течение ≥30 мин.

8.4.7 Готовят среду RPMI 1640. В ББББ отбирают 100,0 мл из каждого из трех предварительно нагретых 1000-мл флаконов со средой RPMI 1640 и помещают в контейнер соответствующего размера, маркированный «отходы».

8.4.8 В ББББ добавляют реагенты во флакон со средой RPMI 1640. В ББББ добавляют следующие реагенты в каждый из трех флаконов со средой RPMI 1640. Записывают объем, добавленный в каждый флакон. Человеческая сыворотка GemCell, инактивированная нагреванием, типа AB (100,0 мл), GlutaMax (10,0 мл), гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл), 2-меркаптоэтанол (1,0 мл).

8.4.9 Фильтруют среду. Закрывают крышками флаконы из этапа 8.4.8 и вращают для тщательного смешивания реагентов. Фильтруют каждый флакон среды через отдельную 1-л фильтровальную ячейку с размером пор 0,22 микрон.

8.4.10 Маркируют фильтрованную среду. Асептически закрывают фильтрованную среду и маркируют каждый флакон «среда CM1, день 11».

8.4.11 Размораживают аликвоты IL-2. Размораживают 3×1,1 мл аликвоты IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) до полного таяния льда. Записывают для IL-2 № лота и срок хранения.

ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются, что этикетка для IL-2 прикреплена.

8.4.12 Извлекают среду AIM-V из инкубатора. Извлекают три флакона со средой AIM-V из инкубатора. Записывают время окончания инкубации на этапе 8.4.4. Убеждаются, что среда нагревалась в течение ≥30 мин.

8.4.13 Добавляют IL-2 в AIM-V. В БББ, используя микропипетку, добавляют 3,0 мл размороженного IL-2 в один 1-л флакон с предварительно нагретой средой AIM-V. Промывают наконечник микропипетки средой после добавления IL-2. Используют новый стерильный наконечник микропипетки для каждой аликвоты. Записывают общий добавленный объем. Маркируют флакон «AIM-V, содержащая IL-2».

8.4.14 Переносят материалы. Асептически переносят 10-л мешок Labtainer™ и набор для перекачивания жидкости с насосом в БББ.

8.4.15 Готовят 10-л мешок Labtainer™ для среды. Закрывают все линии на 10-л мешке Labtainer™. Соединяют большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом со средней канюлей на 10-л мешке Labtainer™ через крепление Люэра.

8.4.16 Готовят насос Ваха. Помещают насос Ваха рядом с БББ. Пропускают трубку набора для перекачивания жидкости через насос Ваха, расположенный снаружи от БББ.

Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9».

8.4.17 Готовят 10-л мешок Labtainer™ для среды. В БББ извлекают шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) и выбрасывают. Принимают меры для сохранения стерильности пипетки PLDS.

8.4.18 Готовят 10-л мешок Labtainer™ для среды. Соединяют пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра, и помещают наконечник пипетки во флакон со средой AIM-V, содержащей IL-2 (приготовленной на этапе 8.4.13), для аспирации. Открывают все зажимы между флаконом со средой и 10-л мешком Labtainer™.

8.4.19 Закачивают среду в 10-л Labtainer™. В БББ, используя PLDS, переносят предварительно нагретую приготовленную среду AIM-V, содержащую IL-2, приготовленную на этапе 8.4.13, а также два дополнительных флакона со средой AIM-V, в 10-л мешок Labtainer™. Добавляют три флакона фильтрованной среды CM1, день 11, из этапа 8.4.10. После добавления последнего флакона очищают линию к мешку. ПРИМЕЧАНИЕ: останавливают насос между добавлениями каждого флакона среды.

8.4.20 Удаляют Pumpmatic™ из мешка Labtainer™. Удаляют PLDS из набора для перекачивания жидкости, и надевают красный колпачок на наконечник Люэра линии в БББ.

8.4.21 Перемешивают среду. Осторожно разминают мешок для перемешивания.

8.4.22 Маркируют среду. В БББ маркируют мешок со средой следующей информацией. Срок годности составляет 24 часа с даты приготовления.

8.4.23 Образец среды в соответствии с планом сбора образцов. В БББ соединяют 60-мл шприц с доступной канюлей мешка «полная среда CM2, день 11», приготовленного на этапе 8.4.22. Отбирают 20,0 мл среды и помещают в 50-мл коническую пробирку.

Надевают красный колпачок на канюлю на мешке «полная среда CM2, день 11».

8.4.24 Маркируют и хранят образец. Маркируют этикеткой в соответствии с перечнем образцов, и хранят архивный образец среды при 2-8°C до передачи его в Login для тестирования.

8.4.25 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.4.26 Запечатывание линии набора для перекачивания жидкости. Вне БББ отделяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красный колпачок на линии набора для перекачивания жидкости, близко к красному колпачку. Оставляют набор для перекачивания жидкости на мешке.

8.4.27 Готовят пробирки для разведений при подсчете клеток. В БББ добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована «для разведений при подсчете клеток» и номером лота, в четыре 15-мл конические пробирки. Маркируют пробирки номером лота и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криопробирки надписью «питающие клетки» и номером пробирки (1-4). Хранят пробирки в БББ для использования на этапе 8.5.30.

8.4.28 Переносят реагенты из БББ в условия 2-8°C. Переносят весь остаток 2-меркаптоэтанола, GlutaMax и человеческой сыворотки из БББ в условия 2-8°C. Убеждаются, что все реагенты маркированы номером лота из документации на партию и соответствующим сроком годности для открытых материалов в соответствии с примечанием к процессу 5.9.

8.4.29 Готовят 1-л мешок для переноса. Вне БББ соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 1-л пакет для переноса с набором для перекачивания жидкости, присоединенным к мешку «полная среда CM2, день 11», приготовленному на этапе 8.4.22. Маркируют пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток» и номером лота.

8.4.30 Готовят 1-л мешок для переноса. Делают отметку на трубке 1-л пакета для переноса на расстоянии нескольких дюймов от мешка. Помещают пустой мешок для переноса на весы, чтобы трубки находились на весах до отметки.

8.4.31 Тарируют весы. Тарируют весы и оставляют пустой мешок для переноса на весах.

8.4.32 Готовят пакет для переноса питающих клеток. Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «средняя» и «4». Закачивают 500,0±5,0 мл «полной среды CM2, день 11», приготовленной на этапе 8.4.22, в мешок для переноса клеток со средой CM2. Измеряют массу и записывают объем полной среды CM2, добавленной в мешок для

переноса.

8.4.33 Запечатывают термосваркой линию. После заполнения запечатывают термосваркой линию в соответствии с примечанием к процессу 5.12. Отделяют мешок со средой CM2, 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.

8.4.34 Если применимо: инкубируют пакет для переноса со средой для питающих клеток. Если применимо, помещают пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток» в инкубатор до использования на этапе 8.6.6.

8.4.35 Инкубируют «полную среду CM2, день 11». Помещают «полную среду CM2, день 11», приготовленную на этапе 8.4.22, в инкубатор до использования на этапе 8.7.2.

8.4.36 Анализируют раздел 8.4.

8.5 День 11 – Сбор ОИЛ

8.5.1 Предпроцессорная таблица. Контролируют инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C; процентное содержание CO2: 5,0±1,5% CO_2.

ПРИМЕЧАНИЕ: действия раздела 8.5 можно выполнять параллельно с действиями разделов 8.4 и 8.6.

8.5.2 Извлекают G-REX 100MCS из инкубатора. Проводят проверку на соответствие параметров инкубации перед извлечением G-REX 100MCS из инкубатора. Нижние пределы такие же, как на этапе 8.3.44 B. Верхний предел, как на этапе 8.3.44 C. Записывают время извлечения из инкубатора. Определяют: является ли время 8.3.44 B ≤время извлечения из инкубатора <время 8.3.44 C? *ЕСЛИ НЕТ, СООБЩАЮТ ТЕРРИТОРИАЛЬНОМУ МЕНЕДЖМЕНТУ. Осторожно извлекают G-REX 100MCS из инкубатора и убеждаются, что все зажимы закрыты, кроме большой линии фильтра. Записывают время начала обработки.

8.5.3 Готовят 300-мл пакет для переноса. Маркируют 300-мл пакет для переноса «суспензия ОИЛ».

8.5.4 Готовят 300-мл пакет для переноса. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) линию переноса суспензии ОИЛ (одну линию) гравитационного фильтра для крови. Смотри, например, Фигуру 129.

8.5.5 Готовят 300-мл пакет для переноса. Помещают 300-мл пакет для переноса на весы и записывают сухую массу.

8.5.6 Готовят 1-л пакет для переноса. Маркируют 1-л пакет для переноса надписью «супернатант» и номером лота.

8.5.7 Соединяют сваркой пакеты для переноса с G-REX 100MCS. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию для удаления среды из G-REX 100MCS с пакетом для переноса «супернатант». Стерильно соединяют 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», приготовленным на этапе 8.5.4. Смотри, например, Фигуру 130.

8.5.8 Установка GatheRex. Помещают G-REX 100MCS слева от GatheRex, а пакеты для переноса «супернатант» и «суспензия ОИЛ» справа.

8.5.9 Установка GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления среды из G-Rex 100MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора клеток из G-REX 100MCS в нижний зажим (маркированный линей линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex.

8.5.10 Установка GatheRex. Соединяют газовую линию от GatheRex со стерильным фильтром флакона G-REX 100MCS. ПРИМЕЧАНИЕ: перед удалением супернатанта из флакона G-REX 100MCS убеждаются, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

8.5.11 Уменьшение объема в G-REX 100MCS. Переносят ~900 мл культурального супернатанта из G-REX 100MCS в 1-л пакет для переноса. Визуально инспектируют флакон G-REX 100MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации. ПРИМЕЧАНИЕ: если Gatherex останавливается преждевременно, его запускают заново, нажимая кнопку со стрелкой, направленной вправо.

8.5.12 Готовят флакон для сбора ОИЛ. После удаления супернатанта закрывают все зажимы на красной линии.

8.5.13 Начинают сбор ОИЛ. Записывают время начала сбора ОИЛ.

8.5.14 Начинают сбор ОИЛ. Энергично постукивают по флакону и вращают для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. Инспектируют флакон, чтобы убедиться, что все клетки открепились. ПРИМЕЧАНИЕ: сообщают территориальному менеджменту, если клетки не открепляются.

8.5.15 Начинают сбор ОИЛ. Наклоняют флакон в сторону от собирающей трубки и позволяют кускам опухоли оседать вдоль края. Медленно наклоняют флакон в сторону собирающей трубки, чтобы куски оставались на противоположной стороне флакона. ПРИМЕЧАНИЕ: если трубка для сбора клеток находится не на стыке стенки и нижней мембраны, постукивания по флакону, с наклонением его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

8.5.16 Собирают ОИЛ. Открывают все зажимы, ведущие к пакету для переноса суспензии ОИЛ.

8.5.17 Собирают ОИЛ. Используя GatheRex, переносят суспензию клеток через фильтр для крови в 300-мл пакет для переноса. ПРИМЕЧАНИЕ: следует продолжать наклонять край до сбора всех клеток и среды.

8.5.18 Собирают ОИЛ. Проверяют мембрану на прикрепленные клетки.

8.5.19 Промывают мембрану флакона. Промывают дно G-REX 100MCS. Покрывают ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой. ПРИМЕЧАНИЕ: если

куски опухоли перекрывают собирающую линию, делают паузу в сборе, нажимая «X» на линии для сбора клеток. Нажимают кнопку «открыть зажимы» на Gatherex, поднимают пакет для переноса и осторожно сжимают с возрастающим давлением до удаления фрагмента. Не следует сжимать мешок слишком сильно, поскольку это может вызвать разрыв линии или мешка. Возобновляют сбор после устранения препятствия.

8.5.20 Закрывают зажимы на G-REX 100MCS. Убеждаются, что все зажимы закрыты.

8.5.21 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) пакет для переноса суспензии ОИЛ как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения.

8.5.22 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой пакет для переноса «супернатант» в соответствии с примечанием к процессу 5.12. Оставляют достаточную длину линии до сварного шва.

8.5.23 Рассчитывают объем суспензии ОИЛ. Записывают массу пакета для переноса суспензии ОИЛ и рассчитывают объем клеточной суспензии.

8.5.24 Готовят пакет для переноса «супернатант» для сбора образца. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 4” набор для переливания плазмы с пакетом для переноса «супернатант», сохраняя крепление Люэра на 4” наборе для переливания плазмы, и переносят в БББ.

8.5.25 Готовят пакет для переноса «суспензия ОИЛ» для сбора образца. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 4” набор для переливания плазмы с 300-мл пакетом для переноса «суспензия ОИЛ», сохраняя крепление Люэра на 4” наборе для переливания плазмы, и переносят в БББ.

8.5.26 Собирают образец для Вас-Т. В БББ, используя шприц соответствующего размера, отбирают примерно 20,0 мл супернатанта из 1-л пакета для переноса «супернатант» и помещают в стерильную 50-мл коническую пробирку, маркированную «Вас-Т». Оставляют в БББ до использования на этапе 8.5.27.

8.5.27 Инокулируют ВасТ в соответствии с планом сбора образцов. Отбирают 1,0-мл образец из 50-мл конической пробирки, маркированной «Вас-Т», приготовленной на этапе 8.5.26, используя шприц соответствующего размера, и инокулируют в анаэробный флакон. Записывают время инокуляции флакона, используя пространство на этикетке флакона. Повторяют вышеописанную процедуру для аэробного флакона. ПРИМЕЧАНИЕ: данный этап можно проводить не последовательно.

8.5.28 Маркируют и хранят образец. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят образец «Вас-Т» при комнатной температуре, защищенным от света, до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов. ПРИМЕЧАНИЕ: не следует закрывать штрихкод на флаконе этикеткой.

8.5.29 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.5.30 Образцы для подсчета клеток ОИЛ. Маркируют 4 криопробирки номером

пробирки (1-4). Используя отдельные 3-мл шприцы, отбирают 4×1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса суспензии ОИЛ с использованием крепления Люэра, и помещают в соответствующие криопробирки.

8.5.31 Закрывают крепление Люэра. Надевают красный колпачок (W3012845) на линию.

8.5.32 Инкубируют ОИЛ. Помещают пакет для переноса ОИЛ в инкубатор до использования.

8.5.33 Выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты с использованием NC-200 и примечания к процессу 5.14. Выполняют начальные подсчеты клеток без разведения.

8.5.34 Записывают объемы образцов для подсчета клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.5.35 Определяют мультипликативный множитель. Общий объем образцов для подсчета клеток: 8.5.34 A+8.5.34 B. Мультипликативный множитель C ÷ 8.5.34 A.

8.5.36 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.5.37 Записывают название файла, результаты определения жизнеспособности и количества клеток из Nucleoview.

8.5.38 Определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток. Жизнеспособность (8.5.37 A+8.5.37 B) ÷ 2. Концентрация жизнеспособных клеток (8.5.37 C+8.5.37 D) ÷ 2.

8.5.39 Определяют верхний предел и нижний предел для количества клеток. Нижний предел: 8.5.38 F x 0,9. Верхний предел: 8.5.38 F x 1,1.

8.5.40 Находятся ли оба подсчитанных количества в приемлемых пределах? Нижний предел: 8.5.37 C и D ≥ 8.5.39 G. Верхний предел: 8.5.37 C и D ≤ 8.5.39 H. *Если в любом случае ответ «нет», проводят второй раунд подсчетов на этапах 8.5.41–8.5.48*.

8.5.41 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты с использованием NC-200 и примечания к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разведение корректируют в соответствии с ожидаемой концентрацией.

8.5.42 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.5.43 Если применимо: определяют мультипликативный множитель. Общий объем образцов для подсчета клеток: 8.5.42 A+8.5.42 B. Мультипликативный множитель C ÷ 8.5.42 A D.

8.5.44 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец

[мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.5.45 Если применимо: записывают количество клеток из Nucleoview.

8.5.46 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток. Определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток.

8.5.47 Если применимо: определяют верхний и нижний предел для количества клеток. Нижний предел: 8.5.46 F x 0,9. Верхний предел: 8.5.46 F x 1,1.

8.5.48 Если применимо: находятся ли подсчитанные количества в приемлемых пределах? Нижний предел: 8.5.45 C и D ≥ 8.5.47 G. Верхний предел: 8.5.45 C и D ≤ 8.5.47 H. ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.5.49 для определения среднего значения.

8.5.49 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов. Средняя концентрация жизнеспособных клеток (A+B+C+D) ÷ 4=СРЕДНЯЯ.

8.5.50 Корректируют объем суспензии ОИЛ. Рассчитывают скорректированный объем суспензии ОИЛ после отбора образцов для подсчета клеток. Общий объем клеток ОИЛ из этапа 8.5.23 C (A). Объем отобранного образца для подсчета клеток (4,0 мл) (B). Скорректированный общий объем клеток ОИЛ C=A-B.

8.5.51 Рассчитывают общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ. Средняя концентрация жизнеспособных клеток*: 8.5.38 F* или 8.5.46 F* или *8.5.49 E*; Общий объем: 8.5.50; Общее количество жизнеспособных клеток: C=A x B. *Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения концентрации жизнеспособных клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ составляет $<5\times10^6$ клеток, сообщают территориальному менеджменту и переходят к этапу 8.7.1. Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ составляет $>5\times10^6$, переходят к этапу 8.5.52.

8.5.52 Расчеты для проточной цитометрии. Если общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ из этапа 8.5.51 C составляет $\geq4{,}0\times10^7$, рассчитывают объем для получения $1{,}0\times10^7$ клеток для образца для проточной цитометрии. *Если имеется $<4{,}0\times10^7$ клеток, Н/П остальные поля в таблице. Переходят к этапу 8.7.1. Общее количество жизнеспособных клеток, необходимое для проточной цитометрии: $1{,}0\times10^7$ клеток. Объем клеток, необходимый для проточной цитометрии: концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.5.51, деленная на $1{,}0\times10^7$ клеток A.

8.5.53 Если применимо: извлекают ОИЛ из инкубатора. Извлекают суспензию ОИЛ из инкубатора и записывают время завершения инкубации на этапе 8.5.32.

8.5.54 Если применимо: собирают образец для проточной цитометрии в соответствии с планом сбора образцов. Используя шприц соответствующего размера, отбирают рассчитанный объем (8.5.52 C) образца для фенотипирования из пакета для переноса «суспензия ОИЛ» и помещают в 50-мл коническую пробирку.

8.5.55 Если применимо: маркируют и хранят образец для проточной цитометрии. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят образец для

проточной цитометрии в условиях 2-8°C до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов.

8.5.56 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.5.57 Если применимо: пересчитывают общее количество жизнеспособных клеток и объем потока. Рассчитывают оставшееся общее количество жизнеспособных клеток и оставшийся объем после отбора образца для цитометрии, как описано ниже.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общее количество жизнеспособных ОИЛ	Этап 8.5.51 C	A. клетки
ОИЛ, отобранные для проточной цитометрии	1×10^7 клеток	B. 1×10^7 клеток
Оставшееся общее количество жизнеспособных ОИЛ	C=A - B	C. клетки
Объем ОИЛ	Этап 8.5.50 C	D. мл
Объем отобранных ОИЛ	Этап 8.5.52 C	E. мл
Оставшийся объем ОИЛ	F=D - E	F. мл

8.5.58 Если применимо: рассчитывают объем ОИЛ. Рассчитывают объем суспензии ОИЛ, соответствующий $2,0\times10^8$ жизнеспособных клеток.

Необходимое общее количество жизнеспособных клеток	**Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.5.51 A**	**Объем суспензии ОИЛ, содержащий $2,0\times10^8$ жизнеспособных клеток C=A÷B**
A. $2,0\times10^8$ клеток	B. клеток/мл	C. мл

8.5.59 Если применимо: рассчитывают объем ОИЛ для удаления. Рассчитывают избыточный объем клеток ОИЛ для удаления.

Общий объем суспензии ОИЛ из этапа 8.5.57 F	**Объем суспензии, содержащий $2,0\times10^8$ ОИЛ, из этапа 8.5.58 C**	**Объем избытка ОИЛ для удаления C=A-B**
A. мл	B. мл	C. мл

8.5.60 Если применимо: удаляют избыток ОИЛ. В БББ, используя шприц соответствующего размера, отбирают рассчитанный объем (этап 8.5.59 C) из мешка для переноса «суспензия ОИЛ». ПРИМЕЧАНИЕ: не используют шприц более одного раза. Используют несколько шприцев, если применимо. Помещают в стерильный контейнер соответствующего размера и маркируют с указанием даты и номера лота. Надевают красный колпачок на линию пакета для переноски «суспензия ОИЛ».

8.5.61 Если применимо: помещают ОИЛ в инкубатор. Помещают пакет для

переноски «суспензия ОИЛ» в инкубатор до использования. Записывают время.

8.5.62 Если применимо: расчеты. Рассчитывают общий удаляемый избыток ОИЛ.

Этап 8.5.51 Объем ОИЛ для удаления, из этапа 8.5.59 C. Рассчитывают общий удаляемый избыток ОИЛ.

Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.5.51 A	**Объем ОИЛ для удаления из этапа 8.5.59 C**	**Общий удаляемый избыток ОИЛ C=A x B**
A. клеток/мл	B. мл	C. клетки

8.5.63 Если применимо: расчеты. Рассчитывают количество среды CS-10 для добавления к избытку клеток ОИЛ из этапа 8.5.62 C. Целевая концентрация клеток для замораживания составляет $1,0\times10^8$ клеток/мл.

Общий удаляемый избыток ОИЛ Этап 8.5.62 C	**Целевая концентрация для замораживания**	**Объем CS-10 для добавления (мл) C=A÷B**
A. клетки	B. $1,0\times10^8$ клеток/мл	C. мл

8.5.64 Если применимо: центрифугируют избыток ОИЛ. Центрифугируют избыток клеточной суспензии ОИЛ. Скорость: 350 x g. Время: 10:00 минут. Температура: окружающей среды, торможение: полное (9), ускорение: полное (9).

8.5.65 Если применимо: рассматривают коническую пробирку. Записывают наблюдения: образовался осадок? супернатант прозрачный? *ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», сообщают территориальному менеджменту.

8.5.66 Если применимо: добавляют CS-10. В БББ асептически удаляют аспирацией супернатант. Осторожно постукивают по дну пробирки для ресуспендирования клеток в оставшейся жидкости.

8.5.67 Если применимо: добавляют CS10. Медленно добавляют объем CS10, рассчитанный на этапе 8.5.63 C.

8.5.68 Если применимо: маркируют флаконы. Маркируют флаконы предоставленными КК этикетками. Прикрепляют этикетку для образца.

8.5.69 Если применимо: заполняют пробирки. Разливают 1,0-мл аликвоты клеточной суспензии в криопробирки соответствующего размера. ПРИМЕЧАНИЕ: не заполняют более 10 пробирок избыточными ОИЛ.

8.5.70 Если применимо: заполняют пробирки. Вносят аликвоты остаточного объема в криопробирки соответствующего размера в соответствии с СОП-00242. Если объем составляет ≤0,5 мл, добавляют CS10 в пробирку до достижения объема 0,5 мл.

8.5.71 Если применимо: заполняют пробирки. Заполняют одну пробирку 1,0 мл CS10 и маркируют «пустая проба».

8.5.72 Если применимо: записывают количество заполненных пробирок. Записывают количество заполненных пробирок ниже, не включая пустую пробу.

8.5.73 Если применимо: мониторинг окружающей среды. После обработки

проверяют, чтобы был произведен мониторинг ББВ и персонала.

Криоконсервирование образца ОИЛ

8.5.74 Если применимо: рассчитывают объем для криоконсервирования. Рассчитывают объем клеток, необходимый для получения 1×10^7 клеток для криоконсервирования.

Общее количество жизнеспособных ОИЛ, необходимое для	**Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.5.51 A**	**Объем клеток, необходимый для криоконсервирования C=A÷B**
A. 1×10^7 клеток	B. клеток/мл	C. мл

8.5.75 Если применимо: отбирают образец для криоконсервирования. В ББВ, используя шприц соответствующего размера, отбирают рассчитанный объем (этап 8.5.74 C) из пакета для переноса «суспензия ОИЛ». Помещают в коническую пробирку соответствующего размера и маркируют надписью «образец для криоконсервирования 1×10^7 клеток», датой и номером лота. Надевают красный колпачок (W3012845) на пакет для переноса «суспензия ОИЛ».

8.5.76 Если применимо: помещают ОИЛ в инкубатор. Помещают пакет для переноса «суспензия ОИЛ» в инкубатор до использования.

8.5.77 Если применимо: образец для криоконсервирования. Центрифугируют «образец для криоконсервирования 1×10^7 клеток», используя следующие параметры: скорость: 350 x g, время: 10:00 минут, температура: окружающей среды, торможение: полное (9); ускорение: полное (9). ПРИМЕЧАНИЕ: следует убедиться, что на центрифуге установлены правильные единицы для скорости и времени.

8.5.78 Если применимо: осматривают коническую пробирку. Записывают наблюдения: образовался осадок? супернатант прозрачный? *ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», сообщают территориальному менеджменту.

8.5.79 Если применимо: добавляют CS-10. В ББВ асептически удаляют аспирацией супернатант. Осторожно постукивают по дну пробирки для ресуспендирования клеток в оставшейся жидкости.

8.5.80 Если применимо: добавляют CS-10. Медленно добавляют 0,5 мл CS10. Записывают добавленный объем.

8.5.81 Если применимо: маркируют пробирку. Маркируют пробирку этикеткой, предоставленной КК.

8.5.82 Если применимо: заполняют пробирки. Разливают аликвоты ресуспендированного объема в маркированные криопробирки.

8.5.83 Если применимо: заполняют емкость с пустой пробой. Наливают в другую пробирку 0,5 мл CS10 и маркируют надписью «пустая проба».

8.5.84 Если применимо: записывают количество заполненных пробирок, не включая «пустую пробу». Пробирки с образцами для криоконсервирования заполняют в объеме ~0,5 мл.

8.5.85 Если применимо: мониторинг окружающей среды. После обработки проверяют, чтобы был произведен мониторинг БББ и персонала.

8.5.86 Анализируют раздел 8.5.

8.6 День 11 - Питающие клетки

8.6.1 Получают питающие клетки. Извлекают 3 мешка питающих клеток с по меньшей мере двумя разными номерами лотов из морозильной камеры с LN_2. Хранят клетки на сухом льду до момента размораживания. ПРИМЕЧАНИЕ: действия раздела 8.6 можно выполнять параллельно с действиями раздела 8.5.

8.6.2 Получают питающие клетки. Записывают информацию для питающих клеток. Подтверждают, что получены по меньшей мере два лота питающих клеток.

8.6.3 Готовят водяную баню или Cryotherm. Готовят водяную баню или Cryotherm для размораживания питающих клеток.

8.6.4 Размораживают питающие клетки. Помещают мешки с питающими клетками в индивидуальные пакеты с застежкой-молнией, на основании номера лота, и размораживают в водяной бане с температурой 37,0 ± 2,0°C или устройстве CytoTherm в течение ~3-5 минут или до момента исчезновения льда. Записывают ниже время размораживания, определенное по таймеру.

8.6.5 Подготовка набора принадлежностей для питающих клеток. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 4S-4M60 с CC2 Cell Connect (W3012820), заменяя одну иглу устройства Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G). Соединяют сваркой H и G (смотри, например, Фигуру 131).

8.6.6 Если применимо: извлекают среду из инкубатора. Извлекают пакет для переноса со средой CM2 для питающих клеток, приготовленный на этапе 8.4.34, из инкубатора.

8.6.7 Соединяют пакет для переноса среды. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток» с креплением Люэра CC2. ПРИМЕЧАНИЕ: мешок будет присоединен к стороне набора принадлежностей с портом для безыгольных инъекций.

8.6.8 Переносят набор принадлежностей. Переносят конструкцию, содержащую полную среду CM2, день 11, в ББББ.

8.6.9 Объединяют размороженные питающие клетки. В ББББ набирают 10 мл воздуха в 100-мл шприц. Используют его для замены 60-мл шприца на CC2.

8.6.10 Объединяют размороженные питающие клетки. Протирают каждый порт на мешках с питающими клетками спиртовой салфеткой перед снятием колпачка. Прокалывают три мешка с питающими клетками, используя три иглы CC2. ПРИМЕЧАНИЕ: поддерживают постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Принимают меры, чтобы не проколоть бок порта.

8.6.11 Объединяют размороженные питающие клетки. Открывают запорный клапан так, чтобы линия от мешков с питающими клетками была открыта, а линия к порту

для безыгольных инъекций была закрыта.

8.6.12 Объединяют размороженные питающие клетки. Набирают содержимое мешков с питающими клетками в шприц. Все три мешка опустошают одновременно. После опустошения мешков с питающими клетками, поддерживая давление в шприце, перекрывают зажимами линию к мешкам с питающими клетками.

8.6.13 Записывают объем питающих клеток. Не отсоединяют шприц от набора принадлежностей. Записывают общий объем питающих клеток в шприце.

8.6.14 Добавляют питающие клетки в пакет для переноса. Поворачивают запорный клапан так, чтобы линия к мешку с питающими клетками была закрыта, а линия к пакету для переноса среды была открыта. Убеждаются, что зажимы сняты на линии к пакету для переноса среды.

8.6.15 Добавляют питающие клетки в пакет для переноса. Выпускают питающие клетки из шприца в пакет для переноса «среда CM2 для питающих клеток». Отсоединяют зажимами линию к пакету для переноса, содержащему питающие клетки, и оставляют шприц соединенным с набором принадлежностей.

8.6.16 Перемешивают объединенные питающие клетки. Разминают мешок для перемешивания объединенных питающих клеток в пакете для переноса.

8.6.17 Маркируют пакет для переноса. Маркируют мешок надписью «суспензия питающих клеток» и номером лота.

8.6.18 Рассчитывают общий объем в пакете для переноса. Рассчитывают общий объем суспензии питающих клеток.

8.6.19 Отбирают образцы для подсчета клеток. Используя отдельный 3-мл шприц для каждого образца, отбирают 4x 1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса с суспензией питающих клеток с использованием порта для безыгольных инъекций. Помещают аликвоты каждого образца в криопробирки, маркированные на этапе 8.4.27. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций стерильным спиртовым тампоном (W3009488) и перемешивают суспензию питающих клеток каждый раз перед отбором образца для подсчета клеток.

8.6.20 Выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание к процессу 5.14. Разбавляют 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 приводит к разведению 1:10. Корректируют в случае необходимости.

8.6.21 Записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.6.22 Определяют мультипликативный множитель

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.6.21 A+8.6.21 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.6.21 A	D.

8.6.23 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя.

8.6.24 Записывают название файла, результаты определения жизнеспособности и количества клеток из Nucleoview.

8.6.25 Определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	(8.6.24 A+8.6.24 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.6.24 C+8.6.24 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.6.26 Определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.6.25 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.6.25 F x 1,1	H. клеток/мл

8.6.27 Находятся ли оба подсчитанных количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.6.24 C и D ≥ 8,6,26 G	
Верхний предел	8.6.24 C и D ≤ 8.6.26 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», выполняют вторую серию подсчетов на этапах 8.6.28–8.6.35.

8.6.28 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 в соответствии с СОП-00314 и примечание к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разведение можно соответствующим образом корректировать, исходя из ожидаемой концентрации клеток.

8.6.29 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.6.30 Если применимо: определяют мультипликативный множитель.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.6.29 A+8.6.29 B	C. мл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.6.29 A	D.

8.6.31 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200,

«разведение [мкл]» = 0.

8.6.32 Если применимо: записывают количества клеток из Nucleoview.

8.6.33 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	(8.6.32 A+8.6.32 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.6.32 C+8.6.32 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.6.34 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.6.33 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.6.33 F x 1,1	H. клеток/мл

8.6.35 Если применимо: находятся ли количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.6.32 C и D ≥ 8.6.34 G	
Верхний предел	8.6.32 C и D ≤ 8.6.34 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.6.36 для выяснения общей средней концентрации жизнеспособных клеток и продолжат расчеты.

8.6.36 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов.

8.6.37 Корректируют объем суспензии питающих клеток. Рассчитывают скорректированный объем суспензии питающих клеток после отбора образцов для подсчета клеток. Общий объем питающих клеток из этапа 8.6.18 C минус отобранные 4,0 мл.

8.6.38 Рассчитывают общее количество жизнеспособных питающих клеток.

Параметр	Формула	Результат
Средняя концентрация жизнеспособных клеток*	8.6.25 F* -или- 8.6.33 F* -или- 8.6.36 E*	A. клеток/мл
Общий объем	8.6.37 C	B. мл
Общее количество жизнеспособных клеток	A x B	C. клетки

Если общее количество жизнеспособных клеток составляет $<5\times10^9$, переходят к этапу 8.6.39. Если общее количество жизнеспособных клеток составляет ≥5 $x10^9$,

переходят к этапу 8.5.70.

8.6.39 Если применимо: получают дополнительные питающие клетки. Извлекают дополнительный мешок питающих клеток из морозильной камеры с LN_2. Хранят клетки на сухом льду до размораживания.

8.6.40 Если применимо: получают дополнительные питающие клетки. Записывают информацию о питающих клетках.

8.6.41 Если применимо: размораживают дополнительные питающие клетки. Помещают 4-й мешок с питающими клетками в пакет с застежкой-молнией и размораживают в водяной бане с температурой 37,0 ± 2,0°C или устройстве CytoTherm в течение ~3-5 минут или до момента исчезновения льда. Записывают время размораживания.

8.6.42 Если применимо: объединяют дополнительные питающие клетки. В БББ набирают 10 мл воздуха в 100-мл шприц. Используют его для замены шприца на наборе принадлежностей.

8.6.43 Если применимо: объединяют дополнительные питающие клетки. Протирают порт на мешке с питающими клетками спиртовой салфеткой перед снятием колпачка. Прокалывают мешок с питающими клетками, используя одну из оставшихся игл набора принадлежностей, приготовленного на этапе 8.6.7. ПРИМЕЧАНИЕ: поддерживают постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Принимают меры, чтобы не проколоть бок порта.

8.6.44 Если применимо: объединяют дополнительные питающие клетки. Открывают запорный клапан так, чтобы линия от мешка с питающими клетками была открыта, а линия к порту для безыгольных инъекций была закрыта.

8.6.45 Если применимо: объединяют дополнительные питающие клетки. Набирают содержимое мешка с питающими клетками в шприц. Записывают объем.

8.6.46 Если применимо: измеряют объем. Измеряют объем питающих клеток в шприце и записывают ниже (B). Рассчитывают новый общий объем питающих клеток.

Объем питающих клеток из этапа 8.6.37 C	**Объем питающих клеток из этапа 8.6.45**	**Общий объем питающих клеток C=A+B**
A. мл	B. мл	C. мл

8.6.47 Если применимо: добавляют питающие клетки в пакет для переноса. Поворачивают запорный клапан так, чтобы линия к мешку с питающими клетками была закрыта, а линия к мешку для переноса «суспензия питающих клеток» была открыта. Убеждаются, что зажимы сняты на линии к пакету для переноса. Выпускают питающие клетки из шприца в пакет для переноса «суспензия питающих клеток». Зажимают линию к пакету для переноса и оставляют шприц соединенным с набором принадлежностей.

8.6.48 Если применимо: добавляют питающие клетки в пакет для переноса. Разминают мешок для перемешивания объединенных питающих клеток в пакете для

переноса «суспензия питающих клеток».

8.6.49 Если применимо: готовят разведения. В ББВ добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована надписью «для разведений при подсчете клеток» и номером лота, в четыре 15-мл конические пробирки. Маркируют пробирки номером лота и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криопробирки надписью «дополнительные питающие клетки» и номером пробирки (1-4).

8.6.50 Если применимо: готовятся к подсчету клеток. Используя отдельный 3-мл шприц для каждого образца, отбирают 4x 1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса с суспензией питающих клеток с использованием порта для безыгольных инъекций. Помещают аликвоты каждого образца в криопробирки, маркированные на этапе 8.6.49. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций стерильным спиртовым тампоном и перемешивают суспензию питающих клеток каждый раз перед отбором образца для подсчета клеток.

8.6.51 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание к процессу 5.14. Разбавляют 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 приводит к разведению 1:10. Корректируют в случае необходимости.

8.6.52 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.6.53 Если применимо: определяют мультипликативный множитель.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.6.52 A+8.6.52 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.6.52 A	D.

8.6.54 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя.

8.6.55 Если применимо: записывают название файла, результаты определения жизнеспособности и количества клеток из Nucleoview.

8.6.56 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Жизнеспособность	(8.6.55 A+8.6.55 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.6.55 C+8.6.55 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.6.57 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.6.56 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.6.56 F x 1,1	H. клеток/мл

Находятся ли оба количества в приемлемых пределах? ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», проводят вторую серию подсчетов на этапах 8.5.59–8.5.65.

8.6.59 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавление можно корректировать, исходя из ожидаемой концентрации клеток.

8.6.60 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.6.61 Если применимо: определяют мультипликативный множитель.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.6.60 A+8.6.60 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.6.60 A	D.

8.6.62 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.6.63 Если применимо: записывают количества клеток из Nucleoview.

8.6.64 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	(8.6.63 A+8.6.63 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.6.63 C+8.6.63 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.6.65 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.6.64 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.6.64 F x 1,1	H. клеток/мл

8.6.66 Если применимо: находятся ли количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.6.63 C и D ≥ 8.6.65 G	
Верхний предел	8.6.63 C и D ≤ 8.6.65 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.6.67 для выяснения общей средней концентрации жизнеспособных клеток и продолжат расчеты.

8.6.67 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов.

8.6.68 Если применимо: корректируют объем суспензии питающих клеток. Рассчитывают скорректированный объем суспензии питающих клеток после отбора образцов для подсчета клеток. Общий объем питающих клеток из этапа 8.6.46 C минус отобранные 4,0 мл.

8.6.69 Если применимо: рассчитывают общее количество жизнеспособных питающих клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Средняя концентрация жизнеспособных клеток*	8.6.56 F* -или- 8.6.64 F* -или- 8.6.67 E*	A. клеток/мл
Общий объем	8.6.68 C	B. мл
Общее количество жизнеспособных клеток	A x B	C. клетки

*Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения концентрации жизнеспособных клеток.

8.6.70 Рассчитывают объем питающих клеток. Рассчитывают объем суспензии питающих клеток, необходимый для получения 5×10^9 жизнеспособных питающих клеток.

Необходимое количество питающих клеток	**Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.6.38 A* или этапа 8.6.69 A***	**Объем питающих клеток=5×10^9 жизнеспособных клеток C=A÷B**
A. 5×10^9 жизнеспособных клеток	B. клеток/мл	C. мл

*Обводят кружком применимый этап

8.6.71 Рассчитывают избыточный объем питающих клеток. Рассчитывают объем избытка питающих клеток для удаления. Округляют до ближайшего целого числа.

Общий объем питающих клеток в мешке для переноса из этапа 8.6.46 C* или этапа 8.6.68 C*	**Объем питающих клеток=5×10^9 жизнеспособных клеток из этапа 8.6.70 C**	**Объем избытка питающих клеток для удаления. Жизнеспособные клетки C=A-B**

A. мл	B. мл	C. мл

*Обводят кружком применимый этап

8.6.72 Удаляют избыток питающих клеток. В новый 100-мл шприц набирают 10 мл воздуха и присоединяют шприц к набору принадлежностей.

8.6.73 Удаляют избыток питающих клеток. Открывают линию к пакету для переноса «суспензия питающих клеток». Используя шприц, отбирают объем питающих клеток, рассчитанный на этапе 8.6.71 C, плюс дополнительные 10,0 мл из пакета для переноса в 100-мл шприц. Закрывают линию к пакету для переноса «суспензия питающих клеток» после удаления объема питающих клеток. Не удаляют последний шприц. ПРИМЕЧАНИЕ: после заполнения шприца заменяют его новым шприцем. Можно использовать несколько шприцев для удаления всего объема. При использовании каждого нового шприца набирают 10 мл воздуха.

8.6.74 Записывают объем. Записывают общий объем (включая дополнительные 10 мл) отобранных питающих клеток.

8.6.75 Добавляют OKT3. В БББ, используя 1,0-мл шприц и иглу 16G, отбирают 0,15 мл OKT3.

8.6.76 Добавляют OKT3. Асептически отделяют иглу от шприца и соединяют шприц с портом для безыгольных инъекций. Вводят инъекцией OKT3.

8.6.77 Добавляют OKT3. Открывают запорный клапан к пакету для переноса «суспензия питающих клеток» и добавляют 10 мл питающих клеток, удаленных на этапе 8.6.73, для смыва OKT3 через линию.

8.6.78 Добавляют OKT3. Переворачивают шприц вверх дном и проталкивают воздух для очистки линии к пакету для переноса «суспензия питающих клеток».

8.6.79 Добавляют OKT3. Оставляют остаточную суспензию питающих клеток в шприце. Закрывают все зажимы и извлекают набор принадлежностей из БББ.

8.6.80 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) пакет для переноса «суспензия питающих клеток», оставляя достаточную длину трубки для сварки. Выбрасывают набор принадлежностей.

8.6.81 Анализируют раздел 8.6

8.7 День 11 – Заполнение G-Rex и высевание

8.7.1 Подготовка G-Rex 500MCS. Вне БББ извлекают G-Rex 500MCS из упаковки и инспектируют флакон в отношении трещин и перегибов трубок. Убеждаются, что все крепления Люэра и зажимы закрываются плотно. Закрывают все зажимы на линиях G-Rex 500MCS, кроме линии вентиляционного фильтра. Используя маркер, проводят черту на уровне 4,5 л.

8.7.2 Извлекают среду из инкубатора. Извлекают «полную среду CM2, день 11», приготовленную на этапе 8.4.35, из инкубатора.

8.7.3 Проводят подготовку к закачиванию среды. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости с насосом, соединенным с пакетом «полная среда CM2, день

11».

8.7.4 Проводят подготовку к закачиванию среды. Подвешивают мешок «полная среда CM2, день 11» на штатив для внутривенных вливаний. Пропускают трубку насоса через насос Ваха.

8.7.5 Закачивают среду в G-REX 500MCS. Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9». Закачивают 4,5 л среды в G-Rex 500MCS, заполняя до черты на флаконе, отмеченной на этапе 8.7.1.

8.7.6 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красную линию G-Rex 500MCS вблизи сварного шва, созданного на этапе 8.7.3.

8.7.7 Маркируют флакон. Маркируют флакон предоставленной КК прикрепляемой этикеткой «день 11».

8.7.8 Если применимо: инкубируют флакон. Выдерживают флакон в инкубаторе в ожидании высевания ОИЛ.

8.7.9 Соединяют сваркой пакет для переноса суспензии питающих клеток с флаконом. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию G-Rex 500MCS с пакетом для переноса «суспензия питающих клеток».

8.7.10 Добавляют питающие клетки в G-Rex 500MCS. Открывают все зажимы между пакетом с суспензией питающих клеток и G-Rex 500MCS, и добавляют суспензию питающих клеток во флакон под действием силы тяжести. Убеждаются, что линия полностью чистая.

8.7.11 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красную линию вблизи сварного шва, созданного на этапе 8.7.9.

8.7.12 Соединяют сваркой пакет для переноса «суспензия ОИЛ» с флаконом. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию G-Rex 500MCS с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ».

8.7.13 Добавляют ОИЛ в G-Rex 500MCS. Открывают все зажимы между пакетом «суспензия ОИЛ» и G-Rex 500MCS, и добавляют суспензию ОИЛ во флакон под действием силы тяжести. Убеждаются, что линия была полностью очищена.

8.7.14 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красную линию вблизи сварного шва, созданного на этапе 8.7.12, для удаления мешка с суспензией ОИЛ.

8.7.15 Инкубируют G-Rex 500MCS. Убеждаются, что все зажимы на G-Rex 500MCS закрыты, за исключением большой линии фильтра, и помещают в инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.7.16 Рассчитывают окно инкубации. Выполняют расчеты для определения надлежащего времени для извлечения G-Rex 500MCS из инкубатора в день 16. Время инкубации (этап 8.7.15). Нижний предел: время инкубации+108 часов. Верхний предел:

время инкубации+132 часа.

8.7.17 Мониторинг окружающей среды. После обработки проверяют, чтобы был произведен мониторинг ББВ и персонала.

8.7.18 Передают образцы. Передают образцы в Login.

8.7.19 Анализируют раздел 8.7

8.8 День 11 – Криоконсервирование избытка ОИЛ

8.8.1 Если применимо: замораживают флаконы с избыточными ОИЛ. Перед заморозкой проверяют настройки CRF. Выполняют криоконсервирование.

8.8.2 Если применимо: запускают CRF. Записывают общее количество флаконов, помещенных в CRF (не включая пустую пробу). Проверяют, чтобы количество флаконов, перенесенных в CRF, совпадало с точным количеством флаконов, приготовленных на этапе 8.5.72 или этапе 8.5.84.

8.8.3 Если применимо: запускают автоматизированную часть профиля заморозки. Записывают ВРЕМЯ НАЧАЛА автоматизированной части профиля заморозки.

8.8.4 Если применимо: переносят флаконы из морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки в соответствующее хранилище. После завершения заморозки переносят флаконы из CRF в соответствующий контейнер для хранения.

8.8.5 Если применимо: переносят флаконы в соответствующее хранилище. Записывают местонахождение в хранилище с LN_2.

8.8.6 Анализируют раздел 8.8

8.9 День 16 – Приготовление среды

8.9.1 Предварительно нагревают среду AIM-V. Извлекают три 10-л мешка со средой CTS AIM-V из условий 2-8°C по меньшей мере за 12 часов до использования и оставляют при комнатной температуре, защищая от света. Убеждаются, что не истек срок годности у каждого мешка. Маркируют каждый мешок номером мешка (1-3), номером лота, датой и надписью «время начала нагревания ЧЧММ». Записывают время начала нагревания и дату.

8.9.2 Рассчитывают время, в течение которого среда из этапа 8.9.1 нагревается. Рассчитывают время нагревания мешков со средой 1, 2 и 3 из этапа 8.9.1. Следят за тем, чтобы все мешки нагревались в течение 12-24 часов.

8.9.3 Проверяют санитарную обработку помещения, чистоту линий и материалы. Подтверждают проведение санитарной обработки, чистоту линий и соответствие материалов.

8.9.4 Проверяют заполнение предпроцессорной таблицы.

8.9.5 Мониторинг окружающей среды. Перед обработкой убеждаются, что был начат предпроцессорный мониторинг окружающей среды.

8.9.6 Готовят 10-л Labtainer™ для супернатанта. В ББВ соединяют большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с одной из канюль 10-л мешка Labtainer™ с использованием креплений Люэра.

8.9.7 Готовят 10-л Labtainer™ для супернатанта. Маркируют надписью

«супернатант» и номером лота.

8.9.8 Готовят 10-л Labtainer™ для супернатанта. Убеждаются, что все зажимы закрыты, перед извлечением из БББ. ПРИМЕЧАНИЕ: мешок для супернатанта используют в процессе сбора ОИЛ (раздел 8.10), который можно проводить параллельно с подготовкой среды.

8.9.9 Размораживают IL-2. Размораживают 5×1,1-мл аликвот IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) на каждый мешок среды CTS AIM-V до полного таяния льда. Записывают для IL-2 номер лота и срок годности. Прикрепляют этикетки для IL-2.

8.9.10 Добавляют аликвоту GlutaMax. В БББ вносят аликвоту 100,0 мл Glutamax в приемный сосуд соответствующего размера. Записывают объем, добавленный в каждый приемный сосуд. ПРИМЕЧАНИЕ: сначала готовят один мешок среды AIM-V после этапа 8.9.10 - этапа 8.9.28. Необходимые дополнительные мешки определяют на этапе 8.10.59.

8.9.11 Маркируют приемные сосуды. Маркируют каждый приемный сосуд «GlutaMax».

8.9.12 Добавляют IL-2 к GlutaMax. Используя микропипетку, добавляют 5,0 мл IL-2 в каждый приемный сосуд с GlutaMax. Следят за промыванием наконечника в соответствии с примечанием к процессу 5.18, и используют новый наконечник пипетки для каждого добавляемого мл. Записывают объем, добавленный в каждый приемный сосуд с Glutamax.

8.9.13 Маркируют приемные сосуды. Маркируют каждый приемный сосуд надписью «GlutaMax+IL-2» и номером приемного сосуда.

8.9.14 Готовят мешок со средой CTS AIM-V для препарата. Убеждаются, 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. Записывают время окончания инкубации на этапе 8.9.2.

8.9.15 Готовят мешок со средой CTS AIM-V для препарата. В БББ закрывают зажим на 4” наборе для переливания плазмы, затем соединяют с мешком, используя игольные порты. ПРИМЕЧАНИЕ: поддерживают постоянное давление при повороте иглы в одном направлении. Принимают меры, чтобы не проколоть бок порта.

8.9.16 Готовят мешок со средой CTS AIM-V для препарата. Соединяют большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с 4” набором для переливания плазмы через крепление Люэра.

8.9.17 Устанавливают насос Ваха. Помещают насос Ваха рядом с БББ. Извлекают секцию трубки набора для перекачивания жидкости с насосом из БББ и устанавливают в перистальтический насос.

8.9.18 Проводят подготовку к формулированию среды. В БББ извлекают шприц из системы дозирования жидкости Pumpmatic™ (PLDS) и выбрасывают. ПРИМЕЧАНИЕ: принимают меры для сохранения стерильности пипетки PLDS.

8.9.19 Проводят подготовку к формулированию среды. Соединяют пипетку PLDS с меньшего диаметра концом набора для перекачивания жидкости с насосом через

крепление Люэра, и помещают наконечник пипетки во флакон «GlutaMax+IL-2», приготовленный на этапе 8.9.13, для аспирации. Открывают все зажимы между приемным сосудом и 10-л мешком.

8.9.20 Закачивают GlutaMax+IL-2 в мешок. Устанавливают скорость насоса на отметку «средняя» и «3», и закачивают «GlutaMax+IL-2» в 10-л мешок со средой CTS AIM-V. Когда раствор заканчивается, очищают линию и останавливают насос. Записывают объем GlutaMax с IL-2, добавленный в каждый из мешков с AIM-V. Производят записи.

8.9.21 Извлекают PLDS. Убеждаются, что все зажимы закрыты, и извлекают пипетку PLDS из набора для перекачивания жидкости с насосом. Извлекают набор для перекачивания жидкости с насосом и закрывают красным колпачком 4” набор для переливания плазмы.

8.9.22 Маркируют мешки. Маркируют каждый приготовленный мешок надписью «полная среда CM4, день 16».

8.9.23 Отбирают архивные образцы среды в соответствии с планом сбора образцов. Используя 30-мл шприц, извлекают 20,0 мл «полной среды CM4, день 16», соединяя шприц с 4” набором для переливания плазмы, и помещают образец в 50-мл коническую пробирку. ПРИМЕЧАНИЕ: отбирают архивный образец среды только из первого приготовленного мешка со средой. ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются, что 4” набор для переливания плазмы либо имеет закрытые зажимы, либо закрыт красным колпачком после удаления шприца.

8.9.24 Соединяют новый набор для перекачивания жидкости с насосом. Соединяют большего диаметра конец нового набора для перекачивания жидкости с насосом с 4” набором для переливания плазмы, который соединен с мешком «полная среда CM4, день 16».

8.9.25 Маркируют и хранят образец. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят архивный образец среды при температуре 2-8°C до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов.

8.9.26 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.9.27 Контролируют инкубатор. Контролируют инкубатор. Если применимо, в соответствии с этапом 8.9.10 контролируют дополнительные приготовленные мешки. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.9.28 Нагревают полную среду CM4, день 16. Нагревают первый мешок полной среды CM4, день 16, в инкубаторе в течение ≥30 минут до готовности к использованию. Если применимо, в соответствии с этапом 8.10.59 нагревают дополнительные мешки.

8.9.29 Готовят разведения. В БББ добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована номером лота из документации на партию и надписью «для разведений при подсчете клеток», в каждую из 4×15-мл конических пробирок. Маркируют конические

пробирки номером лота и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криопробирки номером пробирки (1-4). Хранят пробирки в ББББ для использования на этапе 8.10.31.

8.9.30 Анализируют раздел 8.9

8.10 День 16 – Разделение клеток в ПБР

8.10.1 Предпроцессорная таблица.

8.10.2 Контролируют инкубатор. Контролируют инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.10.3 Извлекают G-REX 500MCS из инкубатора. Проводят проверку на соответствие параметров инкубации перед извлечением G-Rex 500MCS из инкубатора.

Нижний предел из этапа 8.7.16 B (ДДММГГ ЧЧММ)	**Верхний предел из этапа 8.7.16 C (ДДММГГ ЧЧММ)**	**Время извлечения из инкубатора (ДДММГГ ЧЧММ)**	**Время на этапе 8.7.16 B < время извлечения из инкубатора < время на этапе 8.7.16 C Да/Нет***

Извлекают G-REX 500MCS из инкубатора.

8.10.4 Готовят 1-л пакет для переноса. Запечатывают термосваркой 1-л пакет для переноса (W3006645) в соответствии с примечанием к процессу 5.12, оставляя ~12” линии.

8.10.5 Готовят 1-л пакет для переноса. Маркируют 1-л пакет для переноса «суспензия ОИЛ».

8.10.6 Взвешивают 1-л пакет для переноса. Помещают 1-л пакет для переноса, включая полную линию, на весы и записывают сухую массу.

8.10.7 Проводят подготовку GatheRex. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости с насосом на 10-л мешке Labtainer™ «супернатант», приготовленном на этапе 8.9.8. Стерильно соединяют сваркой прозрачную линию для удаления клеток из G-Rex 500MCS с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ», приготовленным на этапе 8.10.5.

8.10.8 Проводят подготовку GatheRex. Помещают флакон G-Rex 500MCS слева от GatheRex. Помещают мешок Labtainer™ «супернатант» и пакет для переноса «суспензия ОИЛ» справа.

8.10.9 Проводят подготовку GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора клеток из G-Rex 500MCS в нижний зажим (маркированный линей линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex.

8.10.10 Проводят подготовку GatheRex. Соединяют газовую линию от GatheRex со

стерильным фильтром G-Rex500 MCS. ПРИМЕЧАНИЕ: перед удалением супернатанта из G-Rex 500MCS, убеждаются, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

8.10.11 Уменьшение объема в G-Rex 500MCS. Переносят ~4,5 л культурального супернатанта из G-Rex 500MCS в 10-л Labtainer™ в соответствии с СОП-01777. Визуально инспектируют флакон G-REX 500MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации. ПРИМЕЧАНИЕ: если Gatherex останавливается преждевременно, его можно запускать заново, нажимая кнопку со стрелкой, направленной вправо.

8.10.12 Готовят флакон для сбора ОИЛ. После удаления супернатанта закрывают все зажимы на красной линии.

8.10.13 Начало сбора ОИЛ. Записывают время начала сбора ОИЛ.

8.10.14 Начало сбора ОИЛ. Энергично постукивают по флакону и вращают для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: сообщают территориальному менеджменту, если клетки не открепляются.

8.10.15 Начало сбора ОИЛ. Наклоняют 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 наклонением его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

8.10.16 Сбор ОИЛ. Открывают все зажимы, ведущие к пакету для переноса суспензии ОИЛ.

8.10.17 Сбор ОИЛ. Используя GatheRex, переносят клеточную суспензию в пакет для переноса суспензии ОИЛ. ПРИМЕЧАНИЕ: следует следить за поддержанием наклонного положения до полного сбора всех клеток и среды.

8.10.18 Сбор ОИЛ. Проверяют мембрану на прикрепленные клетки.

8.10.19 Промывают мембрану флакона. Промывают дно G-Rex 500MCS. Покрывают ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой.

8.10.20 Закрывают зажимы на G-Rex 500MCS. Убеждаются, что все зажимы закрыты на G-Rex 500MCS.

8.10.21 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) пакет для переноса, содержащий ОИЛ, как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения.

8.10.22 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой 10-л Labtainer™, содержащий супернатант (в соответствии с примечанием к процессу 5.12), и переносят в ББВ для сбора образцов на этапе 8.10.25.

8.10.23 Рассчитывают объем суспензии ОИЛ. Записывают массу пакета для переноса с клеточной суспензией и рассчитывают объем суспензии.

8.10.24 Готовят пакет для переноса для отбора образца. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 4” набор для переливания плазмы с пакетом для переноса «суспензия ОИЛ» из этапа 8.10.21, оставляя канюлю Люэра как можно

ближе к мешку.

8.10.25 Отбирают образцы для тестирования из клеточного супернатанта. В БББ отбирают 10,0 мл супернатанта из 10-л Labtainer™, используя канюлю Люэра и шприц соответствующего размера. Помещают в 15-мл коническую пробирку, маркируют надписью «Bac-T» и сохраняют пробирку с образцом для Bac-T на этапе 8.10.28.

8.10.26 Отбирают образцы для тестирования из клеточного супернатанта. Используя отдельный шприц, отбирают 10,0 мл супернатанта и помещают в 15-мл коническую пробирку. Сохраняют пробирку с образцом для анализа микоплазмы для использования на этапе 8.10.32. Маркируют пробирку надписью «разбавитель для анализа микоплазмы».

8.10.27 Закрывают мешок с супернатантом. Закрывают красным колпачком канюлю Люэра, закрывая мешок, и выносят из БББ.

8.10.28 Сбор образцов для тестирования стерильности и BacT. В БББ отбирают 1,0-мл образец из 15-мл конической пробирки, маркированной надписью «BacT», приготовленной на этапе 8.10.25, используя шприц соответствующего размера, и инокулируют в анаэробный флакон. Повторяют вышеперечисленные действия для аэробного флакона. ПРИМЕЧАНИЕ: данный этап можно проводить не последовательно.

8.10.29 Маркируют и хранят образцы. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят образец «BacT» при комнатной температуре, защищенным от света, до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов ПРИМЕЧАНИЕ: не следует закрывать штрихкод на флаконе этикеткой.

8.10.30 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.10.31 Отбирают образцы для подсчета клеток. В БББ, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, отбирают 4×1,0-мл образца для подсчета клеток из пакета для переноса «суспензия ОИЛ» с использованием крепления Люэра. Помещают образцы в криопробирки, приготовленные на этапе 8.9.29.

8.10.32 Отбирают образцы для анализа микоплазмы. Используя 3-мл шприц, отбирают 1,0 мл из пакета для переноса «суспензия ОИЛ» и помещают в 15-мл коническую пробирку, маркированную надписью «разбавитель для анализа микоплазмы», приготовленную на этапе 8.10.26.

8.10.33 Маркируют и хранят образец. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят образец для анализа микоплазмы при температуре 2-8°C до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов.

8.10.34 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.10.35 Готовят пакет для переноса для высевания клеток. В БББ соединяют большего диаметра конец трубки набора для перекачивания жидкости с насосом с адаптером Люэра на пакете для переноса, содержащем ОИЛ. Зажимают линию близко к

пакету для переноса, используя кровоостанавливающий зажим. Надевают красный колпачок на конец набора для перекачивания жидкости с насосом.

8.10.36 Помещают ОИЛ в инкубатор. Извлекают клеточную суспензию из ББВ и помещают в инкубатор до использования. Записывают время.

8.10.37 Выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание к процессу 5.14. Сначала разбавляют образцы для подсчета клеток путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленной на этапе 8.9.29. Это приводит к разведению 1:10.

8.10.38 Записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.10.39 Определяют мультипликативный множитель.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.10.38 A+8.10.38 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.10.38 A	D.

8.10.40 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя.

8.10.41 Записывают название файла, результаты определения жизнеспособности и количества клеток из Nucleoview.

8.10.42 Определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Жизнеспособность	(8.10.41 A+8.10.41 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.10.41 C+8.10.41 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.10.43 Определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	**Формула**	**Результат**
Нижний предел	8.10.42 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.10.42 F x 1,1	H. клеток/мл

8.10.44 Находятся ли оба количества в приемлемых пределах?

Параметр	**Формула**	**Результат (Да/Нет)**
Нижний предел	8.10.41 C и D ≥ 8.10.43 G	
Верхний предел	8.10.41 C и D ≤ 8.10.43 H	

8.10.45 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 и примечание к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавление можно корректировать, исходя из ожидаемой концентрации клеток.

8.10.46 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток.

ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.10.47 Если применимо: определяют мультипликативный множитель.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.10.46 A+8.10.46 B	C. мл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.10.46 A	D.

8.10.48 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.10.49 Если применимо: записывают количества клеток из Nucleoview.

8.10.50 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	(8.10.49 A+8.10.49 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.10.49 C+8.10.49 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.10.51 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.10.50 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.10.50 F x 1,1	H. клеток/мл

8.10.52 Если применимо: находятся ли количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.10.49 C и D ≥ 8.10.51 G	
Верхний предел	8.10.49 C и D ≤ 8.10.51 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.10.53 для определения среднего количества всех собранных клеток.

8.10.53 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов.

8.10.54 Корректируют объем суспензии ОИЛ. Рассчитывают скорректированный объем суспензии ОИЛ после отбора образцов для подсчета клеток. Общий объем клеток ОИЛ из этапа 8.10.23 C минус 5,0 мл, отобранные для тестирования.

8.10.55 Рассчитывают общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ.

Параметр	Формула	Результат

Средняя концентрация жизнеспособных клеток*	8.10.42 F* -или- 8.10.50 F* -или- 8.10.53 E*	A. клеток/мл
Общий объем	8.10.54 C	B. мл
Общее количество жизнеспособных клеток	A x B	C. клетки

8.10.56 Рассчитывают количество флаконов для субкультивирования. Рассчитывают общее количество флаконов для высевания клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: округляют количество флаконов G-Rex 500MCS для засевания в большую сторону до ближайшего целого числа.

Общее количество жизнеспособных клеток из этапа 8.10.55 C **A**	**Целевое количество клеток в расчете на флакон** **B**	**Количество флаконов G-Rex 500MCS для засевания** **C= A÷B**
клетки	$1{,}0\times10^{9}$ клеток/флакон	флаконы

ПРИМЕЧАНИЕ: Максимальное количество флаконов G-Rex 500MCS для засевания составляет пять. Если расчетное количество флаконов для засевания превышает пять, только пять флаконов засевают, ИСПОЛЬЗУЯ ВЕСЬ ДОСТУПНЫЙ ОБЪЕМ КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ.

8.10.57 Рассчитывают количество флаконов для субкультивирования.

Критерий	**Да/Нет**
Количество флаконов G-REX 500MCS для засевания на этапе 8.10.56 C ≤5 Если «да», засевают количество флаконов, рассчитанное на этапе 8.10.58.	
Количество флаконов G-REX 500MCS для засевания на этапе 8.10.56 C >5 Если «да», засевают 5 флаконов ВСЕМИ доступными клетками.	

8.10.58 КК проверяет расчеты при подсчете количества клеток, выполненном на этапах 8.10.38–8.10.57.

8.10.59 Определяют необходимое количество дополнительных мешков со средой. Рассчитывают количество мешков со средой, необходимое помимо мешка, приготовленного на этапе 8.9.28.

Количество флаконов G-Rex 500MCS для засевания (этап 8.10.56 C) **A**	**Необходимое количество мешков со средой** **B=A÷2***	**Количество мешков, приготовленных на этапе 8.9.22**	**Количество дополнительных мешков для подготовки**

		C	D=B-C
		1	

*Округляют необходимое количество мешков со средой в большую сторону до ближайшего целого числа.

8.10.60 Если применимо: готовят дополнительную среду. Готовят один 10-л мешок «среды CM4, день 16» для каждых двух необходимых флаконов G-Rex-500M, рассчитанных на этапе 8.10.59 D. Переходят к этапу 8.10.62 и засевают первый флакон(ы) GREX-500M, пока дополнительную среду готовят и нагревают.

8.10.61 Если применимо: готовят дополнительные мешки со средой. Готовят и нагревают рассчитанное количество дополнительных мешков со средой, определенное на этапе 8.10.59 D, повторяя этап 8.9.10 - этап 8.9.28.

8.10.62 Заполняют G-Rex 500MCS. Открывают G-Rex 500MCS на столешнице и инспектируют флакон в отношении трещин и перегибов трубок. Убеждаются, что все крепления Люэра и зажимы закрываются плотно. Делают отметку на уровне 4500 мл с внешней стороны флакона маркером. Закрывают все зажимы на G-Rex 500MCS, кроме большой линии фильтра.

8.10.63 Заполняют G-Rex 500MCS. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию для среды G-Rex 500MCS с набором для перекачивания жидкости на мешке со средой, приготовленном на этапе 8.9.28.

8.10.64 Проводят подготовку к закачиванию среды. Подвешивают пакет «среда CM4, день 16» на штатив для внутривенных вливаний. Пропускают трубку насоса через насос Ваха.

8.10.65 Закачивают среду в G-Rex 500MCS. Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9», и закачивают 4500 мл среды во флакон. Закачивают 4,5 л «среды CM4, день 16» в G-Rex 500MCS, заполняя до линии, отмеченной на флаконе на этапе 8.10.62. После переноса 4,5 л среды останавливают насос.

8.10.66 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) красную линию для среды G-Rex 500MCS вблизи сварного шва, созданного на этапе 8.10.63, удаляя мешок со средой.

8.10.67 Повторяют заполнение. Повторяют этапы 8.10.62-8.10.66 для каждого флакона, рассчитанного на этапе 8.10.56 C, когда среда нагревается и становится готовой для использования. ПРИМЕЧАНИЕ: можно заполнять несколько флаконов одновременно, используя заполнение под действием силы тяжести или несколько насосов. ПРИМЕЧАНИЕ: заполняют только два флакона на каждый мешок со средой.

8.10.68 Записывают и маркируют заполненный флакон(ы). Маркируют каждый флакон в алфавитном порядке по мере заполнения и прикрепляют предоставленные КК этикетки «день 16».

8.10.69 Маркируют образец. Прикрепляют к образцу этикетку «день 16».

8.10.70 Если применимо: инкубируют флакон. Хранят флакон в инкубаторе в ожидании засевания ОИЛ.

8.10.71 Проверяют количество заполненных флаконов. Записывают общее количество заполненных флаконов.

8.10.72 Рассчитывают объем клеточной суспензии для добавления. Рассчитывают целевой объем суспензии ОИЛ для добавления в новые флаконы G-Rex 500MCS.

Общий объем суспензии ОИЛ из этапа 8.10.54 C **A**	**Количество заполняемых флаконов на этапе 8.10.71**	**Целевой объем клеточной суспензии для переноса в каждый флакон** **C= A÷B**
мл		мл

8.10.56 Если «C» превышает пять, только пять будут засеяны, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВСЕГО ОБЪЕМА КЛЕТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ.

8.10.73 Готовят флаконы для засевания. Извлекают флаконы G-Rex 500MCS из этапа 8.10.70 из инкубатора.

8.10.74 Проводят подготовку для закачивания. Закрывают все зажимы на G-Rex 500MCS, кроме большой линии фильтра. Пропускают трубку насоса через насос Ваха.

8.10.75 Извлекают ОИЛ из инкубатора. Извлекают пакет для переноса «суспензия ОИЛ» из инкубатора и записывают время окончания инкубации на этапе 8.10.36.

8.10.76 Готовят клеточную суспензию для высевания. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) пакет для переноса «суспензия ОИЛ» из этапа 8.10.75 для прокачки входной линии.

8.10.77 Тарируют весы. Помещают мешок с суспензией ОИЛ на весы. Заполняют линию от мешка с суспензией ОИЛ до сварного шва, используя насос Ваха, со скоростью, установленной на отметку «низкая» и «2». Тарируют весы.

8.10.78 Засевают флакон суспензией ОИЛ. Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «средняя» и «5». Закачивают объем суспензии ОИЛ, рассчитанный на этапе 8.10.72 С, во флакон. Записывают объем суспензии ОИЛ, добавленной в каждый флакон.

8.10.79 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) пакет для переноса «суспензия ОИЛ», оставляя достаточной длины трубку до сварного шва, на следующем флаконе. Используют зонд для линии, чтобы протолкнуть остаточную суспензию ОИЛ в линии от флакона G-Rex в емкость.

8.10.80 Заполняют оставшиеся флаконы. Между всеми засеваемыми флаконами обязательно перемешивают пакет для переноса «суспензия ОИЛ», и повторяют этапы 8.10.76-8.10.79 для засевания всех оставшихся флаконов. Заполняют флакон(ы) в алфавитном порядке.

8.10.81 Контролируют инкубатор. ПРИМЕЧАНИЕ: если флаконы должны быть разделены между двумя инкубаторами, обязательно нужно контролировать оба. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37,0±2,0°C, процентное содержание CO_2: 5,0±1,5% CO_2.

8.10.82 Инкубируют флаконы. Записывают время помещения каждого флакона в инкубатор.

8.10.83 Рассчитывают окно инкубации. Производят описанные ниже расчеты для определения временного диапазона для извлечения G-Rex 500MCS из инкубатора в день 22.

Флакон	**8.10.83 A** **Время инкубации (этап 8.10.82) (ДДММГГ ЧЧММ)**	**8.10.83 B** **Нижний предел: Время инкубации+132 часа (ДДММГГ ЧЧММ)**	**8.10.83 C** **Верхний предел: Время инкубации+156 часов (ДДММГГ ЧЧММ)**

8.10.84 Мониторинг окружающей среды. После обработки проверяют, чтобы был произведен мониторинг БББ и персонала.

8.10.85 Передача образцов. Проверяют, чтобы все образцы дня 16 были переданы в Login.

8.10.86 Анализируют раздел 8.10.

8.11 День 22 – Приготовление промывающего буфера

8.11.1 1 Проверяют санитарную обработку помещения, чистоту линий и материалы.

8.11.2 Убеждаются в заполнении предпроцессорной таблицы.

8.11.3 Мониторинг окружающей среды. Перед обработкой убеждаются, что был проведен предпроцессорный мониторинг окружающей среды.

8.11.4 Готовят 10-л мешок Labtainer™. В БББ соединяют 4” набор для переливания плазмы с 10-л мешком Labtainer™ через крепление Люэра.

8.11.5 Приготовленный 10-л мешок Labtainer™ маркируют надписью «супернатант», номером лота и инициалом/датой.

8.11.6 Готовят 10-л мешок Labtainer™. Закрывают все зажимы перед вынесением из ББББ. ПРИМЕЧАНИЕ: готовят один 10-л мешок Labtainer™ для каждых двух флаконов G-Rex 500MCS, из которых будут собраны клетки. ПРИМЕЧАНИЕ: мешок(мешки) с супернатантом используют в разделе 8.12, действия которого можно выполнять параллельно с действиями раздела 8.11.

8.11.7 Соединяют сваркой набор для перекачивания жидкости. Вне ББББ закрывают все зажимы на 4S-4M60. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) набор для перекачивания жидкости с одним из конусов Люэра в 4S-4M60. (Смотри, например, Фигуру 132.)

8.11.8 Переносят материалы в ББББ. Переносят Plasmalyte-A и человеческий альбумин с концентрацией 25% в ББББ. Переносят 4S-4M60 и конструкцию набора для перекачивания жидкости с насосом в ББББ.

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**

8.11.9 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Соединяют 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.

8.11.10 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Соединяют 3000-мл собирающий мешок Origen через крепление Люэра с большего диаметра концом трубки набора для перекачивания жидкости с насосом.

8.11.11 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Закрывают зажимы на неиспользуемых линиях 3000-мл мешка Origen.

8.11.12 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Помещают насос Ваха рядом с БББ. Пропускают трубку набора для перекачивания жидкости через насос Ваха, расположенный вне БББ. Устанавливают скорость насоса Ваха на отметку «высокая» и «9».

8.11.13 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Открывают все зажимы от Plasmalyte-A к 3000-мл мешку Origen.

8.11.14 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Закачивают весь объем Plasmalyte-A в 3000-мл мешок Origen. После переноса всего Plasmalyte-A останавливают насос.

8.11.15 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. При необходимости, удаляют воздух из 3000-мл мешка Origen, меняя направление в насосе на противоположное и меняя положение мешка.

8.11.16 Закачивают Plasmalyte в 3000-мл мешок. Закрывают все зажимы. Отделяют 3000-мл мешок от набора для перекачивания жидкости с насосом через крепление Люэра, и закрывают красным колпачком (W3012845) линию к мешку.

8.11.17 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Открывают вентилируемую мини-иглу. Не нарушая стерильность иглы, убеждаются, что синий колпачок надежно закреплен.

8.11.18 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Прокалывают перегородку флакона с 25% человеческим альбумином вентилируемой мини-иглой. ПРИМЕЧАНИЕ: необходимо принимать меры для соблюдения стерильности иглы.

8.11.19 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Повторяют этап 8.11.17 – этап 8.11.18 два раза для, в общей сложности, трех (3) проколотых флаконов с 25% человеческим альбумином.

8.11.20 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Удаляют синий колпачок с одной вентилируемой мини-иглы, и присоединяют 60-мл

шприц к флакону с 25% человеческим альбумином.

8.11.21 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Отбирают до 60 мл 25% человеческого альбумина. ПРИМЕЧАНИЕ: может быть необходимо использовать более одного флакона 25% человеческого альбумина. При необходимости, отсоединяют шприц от вентилируемой мини-иглы и соединяют его со следующей вентилируемой мини-иглой во флаконе с 25% человеческим альбумином. Не извлекают вентилируемую мини-иглу из флакона с 25% человеческим альбумином.

8.11.22 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. После получения 60 мл удаляют шприц с вентилируемой мини-иглы.

8.11.23 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Соединяют шприц с портом для безыгольных инъекций на 3000-мл мешке Origen, заполненном Plasmalyte-A на этапе 8.11.16. Выпускают весь 25% человеческий альбумин. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций спиртовым тампоном перед каждым использованием.

8.11.24 Добавляют человеческий альбумин с концентрацией 25% в 3000-мл мешок. Повторяют этап 8.11.20 - этап 8.11.23 до достижения конечного объема 120,0 мл 25% человеческого альбумина.

8.11.25 Перемешивают содержимое мешка. Осторожно перемешивают содержимое мешка после добавления всего 25% человеческого альбумина.

8.11.26 Маркируют мешок. Маркируют надписью «промывающий буфер LOVO» и номером лота, и указывают срок годности 24 часа.

8.11.27 Готовят разбавитель IL-2. При помощи 10-мл шприца отбирают 5,0 мл промывающего буфера LOVO, используя порт для безыгольных инъекций на мешке с промывающим буфером LOVO. Помещают промывающий буфер LOVO в 50-мл коническую пробирку и маркируют надписью «разбавитель IL-2» и номером лота. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций спиртовым тампоном перед каждым использованием.

8.11.28 Отбирают аликвоту промывающего буфера LOVO для пустого мешка в CRF. Используя 100-мл шприц, отбирают до 70,0 мл промывающего буфера LOVO из порта для безыгольных инъекций. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций спиртовым тампоном перед каждым использованием.

8.11.29 Отбирают аликвоту промывающего буфера LOVO для пустого мешка в CRF. Надевают красный колпачок на шприц и маркируют надписью «пустой криомешок» и номером лота. ПРИМЕЧАНИЕ: хранят шприц при комнатной температуре до использования на этапе 8.14.3.

8.11.30 Завершают приготовление промывающего буфера. Закрывают все зажимы на мешке с промывающим буфером LOVO.

8.11.31 Размораживают IL-2. Размораживают один 1,1-мл флакон IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) до полного таяния льда. Записывают номер лота IL-2 и срок годности. ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются, что прикреплена этикетка IL-2.

8.11.32 Приготовление IL-2. Добавляют 50 мкл маточного раствора IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) в 50-мл коническую пробирку, маркированную «разбавитель IL-2».

8.11.33 Приготовление IL-2. Заново маркируют коническую пробирку надписью «IL-2 6×10^4», датой, номером лота и сроком годности 24 часа. Закрывают крышкой и хранят при 2-8°C.

8.11.34 Подготовка к криоконсервированию. Помещают 5 криокассет в условия 2-8°C с целью их подготовки для криоконсервирования конечного препарата.

8.11.35 Готовят разведения для подсчета клеток. В БББ добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая была маркирована номером лота и надписью «для разведений при подсчете клеток», в 4 отдельные 15-мл конические пробирки. Маркируют пробирки номером лота из документации на партию и номером пробирки (1-4). Откладывают для использования на этапе 8.12.34.

8.11.36 Проводят подготовку для подсчета клеток. Маркируют 4 криопробирки номером пробирки (1-4). Хранят пробирки в БББ для использования на этапе 8.12.33.

8.11.37 Анализируют раздел 8.11

8.12 День 22 – Сбор ОИЛ

8.12.1 Контролируют инкубатор. Параметры инкубатора: температура на LED дисплее: 37 ± 2,0°C, процентное содержание CO_2: 5%±1,5%. ПРИМЕЧАНИЕ: действия раздела 8.12 можно выполнять параллельно с действиями раздела 8.11.

8.12.2 Извлекают флаконы G-Rex 500MCS из инкубатора. Проверяют флаконы и подтверждают соответствие параметров инкубации перед извлечением G-Rex 500MCS из инкубатора.

Флакон	**Полка**	**Нижний предел из этапа 8.10.83 B (ДДММГГ ЧЧММ)**	**Верхний предел из этапа 8.10.83 C (ДДММГГ ЧЧММ)**	**Время извлечения из инкубатора (ДДММГГ ЧЧММ)**	**Время на этапе 8.10.83 B < время извлечения из инкубатора < время на этапе 8.10.83 C Да/Нет***

ПРИМЕЧАНИЕ: данный этап должен быть выполнен при извлечении каждого флакона из инкубатора.

8.12.3 Готовят собирающий мешок для ОИЛ. Маркируют 3000-мл собирающий мешок надписью «суспензия ОИЛ», номером лота и инициалом/датой.

8.12.4 Запечатывают сваркой лишние крепления. Запечатывают термосваркой два крепления Люэра на собирающем мешке вблизи конца каждого крепления в соответствии с примечанием к процессу 5.12.

8.12.5 Подготовка GatheRex. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS с 10-л мешком Labtainer™, приготовленным на этапе 8.11.5. ПРИМЕЧАНИЕ: сверяются с

примечанием к процессу 5.16 для использования нескольких устройств GatheRex.

8.12.6 Подготовка GatheRex. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) прозрачную линию для удаления клеток из G-Rex 500MCS с собирающим мешком для суспензии ОИЛ, подготовленным на этапе 8.12.3. ПРИМЕЧАНИЕ: сверяются с примечанием к процессу 5.16 для использования нескольких устройств GatheRex.

8.12.7 Подготовка GatheRex. Помещают флакон G-Rex 500MCS слева от GatheRex. Помещают мешок Labtainer™ для супернатанта и собирающий мешок для объединенной суспензии ОИЛ справа.

8.12.8 Подготовка GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления среды из G-Rex 500MCS в верхний зажим (маркированный красной линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора клеток из G-Rex 500MCS в нижний зажим (маркированный линей линией) и направляющие детали для трубки на GatheRex.

8.12.9 Подготовка GatheRex. Соединяют газовую линию от GatheRex со стерильным фильтром G-REX 500MCS. ПРИМЕЧАНИЕ: перед удалением супернатанта из G-Rex 500MCS, убеждаются, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

8.12.10 Уменьшение объема. Переносят ~4,5 л супернатанта из G-Rex 500MCS в мешок для супернатанта. Визуально инспектируют флакон G-REX 500MCS, чтобы убедиться, что флакон выровнен и уровень среды уменьшен до конца погружной трубки для аспирации. При необходимости повторяют этап. ПРИМЕЧАНИЕ: если Gatherex останавливается преждевременно, его можно запускать заново, нажимая кнопку со стрелкой, направленной вправо.

8.12.11 Готовят флакон для сбора ОИЛ. После удаления супернатанта закрывают все зажимы на красной линии.

8.12.12 Начинают сбор ОИЛ. Записывают время начала сбора ОИЛ.

8.12.13 Начинают сбор ОИЛ. Энергично постукивают по флакону и вращают для вихревого движения среды с целью высвобождения клеток. Инспектируют флакон, чтобы убедиться, что все клетки открепились. Помещают 3000-мл собирающий мешок «суспензия ОИЛ» на сухие салфетки на плоской поверхности. ПРИМЕЧАНИЕ: сообщают территориальному менеджменту, если клетки не открепляются.

8.12.14 Начинают сбор ОИЛ. Наклоняют 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 наклонением его под углом 45°, обычно бывает достаточно для правильного размещения трубки.

8.12.15 Сбор ОИЛ. Открывают все зажимы, ведущие к собирающему мешку для суспензии ОИЛ.

8.12.16 Сбор ОИЛ. Используя GatheRex, переносят суспензию ОИЛ в 3000-мл собирающий мешок. ПРИМЕЧАНИЕ: поддерживают наклонное положение до полного

сбора всех клеток и среды.

8.12.17 Сбор ОИЛ. Проверяют мембрану на прикрепленные клетки.

8.12.18 Промывают мембрану флакона. Промывают дно G-Rex 500MCS. Покрывают ~1/4 мембраны для газообмена промывающей средой.

8.12.19 Закрывают зажимы на G-Rex 500MCS. Убеждаются, что все зажимы закрыты.

8.12.20 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) собирающий мешок, содержащий ОИЛ, как можно ближе к сварному шву, чтобы общая длина трубки оставалась практически без изменения.

8.12.21 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) мешок с супернатантом.

8.12.22 Завершают сбор клеток из оставшихся флаконов G-Rex 500MCS. Повторяют этапы 8.12.2 и 8.12.5–8.12.21, объединяя все ОИЛ в один и тот же собирающий мешок.

ПРИМЕЧАНИЕ: НЕОБХОДИМО ЗАМЕНЯТЬ 10-Л МЕШОК ДЛЯ СУПЕРНАТАНТА ПОСЛЕ КАЖДОГО 2-ГО ФЛАКОНА. ПРИМЕЧАНИЕ: сверяются с примечанием к процессу 5.16 для использования нескольких устройств GatheRex.

8.12.23 Готовят исходный мешок LOVO. Получают новый 3000-мл собирающий мешок. Маркируют надписью «исходный мешок LOVO», номером лота и инициалом/датой.

8.12.24 Готовят исходный мешок LOVO. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) трубку на «исходном мешке LOVO», удаляя канюли Люэра, оставляя линию достаточной длины до сварного шва.

8.12.25 Взвешивают исходный мешок LOVO. Помещают пластиковый контейнер соответствующего размера на весы и тарируют. Помещают исходный мешок LOVO, включая порты и линии, в контейнер и записывают сухую массу.

8.12.26 Переносят клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Закрывают все зажимы 170-мкм гравитационного фильтра для крови.

8.12.27 Переносят клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) длинный конец гравитационного фильтра для крови с исходным мешком LOVO.

8.12.28 Переносят клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) одну из двух исходных линий фильтра с собирающим мешком «объединенная суспензия ОИЛ».

8.12.29 Переносят клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. После завершения сварки запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) неиспользуемую линию на фильтре для ее удаления.

8.12.30 Переносят клеточную суспензию в исходный мешок LOVO. Открывают все необходимые зажимы и приподнимают 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 вращают или разминают мешок с суспензией ОИЛ в процессе его опорожнения для поддержания ОИЛ в однородной суспензии.

ПРИМЕЧАНИЕ: не позволяют исходному мешку LOVO свешиваться с фильтрующего устройства. Укладывают исходный мешок LOVO на сухие салфетки на плоской поверхности.

8.12.31 Закрывают все зажимы. После переноса ОИЛ в исходный мешок LOVO закрывают все зажимы.

8.12.32 Запечатывают термосваркой. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) как можно ближе к сварному шву для удаления гравитационного фильтра для крови.

8.12.33 Отбирают образцы для подсчета клеток. В БББ, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, отбирают 4×1,0-мл образца для подсчета клеток из исходного мешка LOVO с использованием порта для безыгольных инъекций. Помещают образцы в криопробирки, приготовленные на этапе 8.11.36. ПРИМЕЧАНИЕ: протирают порт для безыгольных инъекций спиртовым тампоном и перемешивают исходный мешок LOVO перед отбором каждого образца.

8.12.34 Выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты с использованием NC-200 и примечания к процессу 5.14. Сначала разбавляют образцы для подсчета клеток путем добавления 0,5 мл клеточной суспензии в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленной на этапе 8.11.35. Это приводит к разведению 1:10.

8.12.35 Записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.12.36 Определяют мультипликативный множитель

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.12.35 A+8.12.35 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.12.35 A	D.

8.12.37 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.12.38 Записывают количества клеток из Nucleoview.

8.12.39 Определяют средние значения для жизнеспособности, концентрации жизнеспособных клеток и общей концентрации ядросодержащих клеток на основании проведенных подсчетов клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Жизнеспособность	(8.12.38 A+8.12.38 B) ÷ 2	G.
Концентрация жизнеспособных	(8.12.38 C+8.12.38 D) ÷ 2	H. клеток/мл

клеток		
Общая концентрация ядросодержащих клеток	(8.12.38 E+8.12.38 F) ÷ 2	I. клеток/мл

8.12.40 Определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	**Формула**	**Результат**
Нижний предел	8.12.39 H x 0,9	J. клеток/мл
Верхний предел	8.12.39 I x 1,1	K. клеток/мл

8.12.41 Находятся ли оба количества в приемлемых пределах?

Параметр	**Формула**	**Результат (Да/Нет)**
Нижний предел	8.12.38 C и D ≥ 8.12.40 J	
Верхний предел	8.12.38 C и D ≤ 8.12.40 K	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», выполняют вторую серию подсчетов на этапах 8.12.42–8.12.49.

8.12.42 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты с использованием NC-200 и примечания к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавление можно корректировать, исходя из ожидаемой концентрации клеток.

8.12.43 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.12.44 Если применимо: определяют мультипликативный множитель

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.12.43 A+8.12.43 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.12.43 A	D.

8.12.45 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.12.46 Если применимо: записывают количества клеток из Nucleoview.

8.12.47 Если применимо: определяют средние значения для жизнеспособности, концентрации жизнеспособных клеток и общей концентрации ядросодержащих клеток на основании проведенных подсчетов клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Жизнеспособность	(8.12.46 A+8.12.46 B) ÷ 2	G.
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.12.46 C+8.12.46 D) ÷ 2	H. клеток/мл
Общая концентрация	(8.12.46 E+8.12.46 F) ÷ 2	I. клеток/мл

ядросодержащих клеток		

8.12.48 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.12.47 H x 0,9	J. клеток/мл
Верхний предел	8.12.47 H x 1,1	K. клеток/мл

8.12.49 Если применимо: находятся ли количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.12.46 C и D ≥ 8.12.48 J	
Верхний предел	8.12.46 C и D ≤ 8.12.48 K	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.12.50 для определения средних значений.

8.12.50 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток и среднюю концентрацию ядросодержащих клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов.

8.12.51 КК проверяет результаты подсчета клеток. Персонал КК проверяет расчеты, выполненные на этапах 8.12.38–8.12.50.

8.12.52 Взвешивают исходный мешок LOVO. Помещают пластиковый контейнер соответствующего размера на весы и тарируют. Помещают полный исходный мешок LOVO в контейнер и записывают массу. Рассчитывают объем клеточной суспензии.

8.12.53 Рассчитывают общее количество жизнеспособных клеток ОИЛ.

Параметр	Формула	Результат
Средняя концентрация жизнеспособных клеток*	8.12.39 H* -или- 8.12.47 H* -или- 8.12.50 E*	A. клеток/мл
Общий объем	8.12.52 C	B. мл
Общее количество жизнеспособных клеток	A x B	C. клетки
C ≥$1{,}5\times10^{9}$?	Да/Нет**	

*Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения концентрации жизнеспособных клеток.

**Если ответ «да», продолжают. Если ответ «нет», сообщают территориальному менеджменту.

8.12.54 Рассчитывают общее количество ядросодержащих клеток.

Параметр	Формула	Результат

Средняя общая концентрация ядросодержащих клеток*	8.12.39 I* -или- 8.12.47 I* -или- 8.12.50 J*	A. клеток/мл
Общий объем	8,5,52 C	B. мл
Общее количество ядросодержащих клеток	A x B	C. клетки

*Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения общей концентрации ядросодержащих клеток.

8.12.55 Готовят разбавитель для анализа микоплазмы. В БББ отбирают 10,0 мл из одного мешка с супернатантом через порт Люэра для отбора образцов и помещают в 15-мл коническую пробирку. Маркируют 15-мл коническую пробирку надписью «разбавитель для анализа микоплазмы» и хранят в БББ до использования на этапе 8.14.69.

8.12.56 Анализируют раздел 8.12

8.13 LOVO

8.13.1 Включают LOVO, используя выключатель слева на задней панели прибора. ПРИМЕЧАНИЕ: действия этапов 8.13.1-8.13.13 можно выполнять параллельно с действиями разделов 8.11-8.12.

8.13.2 Проверяют весы и датчик давления.

8.13.3 Убеждаются, что ничто не находится ни на одних из весов и проверяют показатели для каждых весов. Записывают значения на этапе 8.13.5. ПРИМЕЧАНИЕ: если какие-либо из весов показывают значения за пределами диапазона 0 ± 2 г, выполняют калибровку весов.

8.13.4 Если все весы находятся в пределах допуска без подвешенных грузов, переходят к подвешиванию 1-кг гири на каждых весах (№1-4) и проверяют показания. Записывают значения на этапе 8.13.5.

8.13.5 Проверяют весы. Записывают отображаемые значения для каждых весов. Если значения находятся в пределах нормального диапазона, продолжают действия. Если значения не находятся в пределах нормального диапазона, выполняют калибровку.

8.13.6 Проверяют показания датчика давления на экране профиля работы прибора и записывают. Приемлемый диапазон для показателей давления составляет 0 ± 10 мм рт.ст. Если отображаемое значение выходит за пределы данного диапазона, сохраняют новые настройки атмосферного давления в соответствии с инструкциями к прибору.

8.13.7 Повторяют этапы. Если проводят новую калибровку весов или сохраняют новые настройки атмосферного давления, повторяют этапы 8.13.3–8.13.6.

8.13.8 Начинают протокол «Сбор ОИЛ G-Rex» из выпадающего списка.

8.13.9 На экране для раствора 1 появляется надпись: тип буфера PlasmaLyte.

8.13.10-8.13.16 Следуют инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

8.13.17 Определяют целевой объем конечного препарата.

ПРИМЕЧАНИЕ: Используя значение общего количества ядросодержащих клеток (ОКЯК) из этапа 8.12.54 С и приведенную ниже схему, определяют целевой объем конечного препарата. Записывают объем конечного препарата (мл)

Диапазон клеток	**Целевой объем конечного препарата (ретентата) (мл)**
0 <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 7{,}1X10^{10}$	165
$7{,}1X10^{10}$ <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1{,}1X10^{11}$	215
$1{,}1X10^{11}$ <общее количество (жизнеспособных+мертвых) клеток $\leq 1{,}5X10^{11}$	265

ПРИМЕЧАНИЕ: если значение ОКЖК из этапа 8.12.53 С составляет $>1{,}5\times10^{11}$, сообщают территориальному менеджменту.

8.13.18–8.13.22 Следуют инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

8.13.23 Загружают одноразовый набор. Перед загрузкой одноразового набора протирают порт датчика давления спиртовой салфеткой, а затем не оставляющей ворс салфеткой. Загружают одноразовый набор. Следуют инструкциям на дисплее по загрузке одноразового набора.

8.13.24 Удаляют мешок с фильтратом. После загрузки стандартного одноразового набора LOVO нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется надпись «информация о контейнере и расположении». Удаляют мешок с фильтратом с весов.

8.13.25 Убеждаются, что контейнер фильтрата являлся «новым» и «не на весах».

8.13.26 Вносят информацию о емкости фильтрата. Стерильно соединяют сваркой вспомогательный мешок LOVO и линию с конусом Люэра имеющегося мешка с фильтратом. Убеждаются, что все зажимы открыты и путь для жидкости свободен. Нажимают на поле ввода емкости контейнера фильтрата. На дисплее появляется цифровая клавиатура. Вносят общую емкость нового фильтрата (5000 мл). Нажимают кнопку «выполнено» для ввода данных. ПРИМЕЧАНИЕ: расчетный объем фильтрата не должен превышать 5000 мл.

8.13.27 Помещают контейнер фильтрата на столешницу. ПРИМЕЧАНИЕ: если трубка была удалена из зажима F во время сварки, вновь помещают трубку в зажим. Помещают новый контейнер фильтрата на столешницу. НЕ подвешивают мешок с фильтратом на весах № 3. Весы № 3 остаются пустыми во время процедуры.

8.13.28 Следуют инструкциям на сенсорном дисплее LOVO после изменений для контейнера фильтрата.

8.13.29 Убеждаются, что набор загружен надлежащим образом. На дисплее появляется трафарет проверки в сухом состоянии одноразового набора. Проверяют, чтобы набор был загружен правильно и все зажимы были открыты. Проверяют все трубки на

перекручивание или другие препятствия, и исправляют при необходимости. Убеждаются, что набор установлен правильно, проверяют все зажимы Роберта. Нажимают кнопку «да». Все механические зажимы LOVO закрываются автоматически, и на дисплее появляется надпись «проверка установки одноразового набора». LOVO проводит серию этапов герметизации для проверки набора.

8.13.30 Результаты проверки набора. Если проверка набора проходит удачно, переходят к следующему этапу. *В случае неудачи, после завершения проверки может быть произведена вторая проверка набора. *В случае неудачи, проверяют все трубки на перекручивание или другие препятствия, и исправляют их. *В случае неудачи, убеждаются, что набор установлен правильно, проверяют все зажимы Роберта. В случае неудачной 2-й проверки набора: сообщают территориальному менеджменту и готовят к установке новый набор в соответствии с разделом 10.0. Необходимо повторение этапов 8.13.23-8.13.30.

8.13.31 Соединяют PlasmaLyte. На дисплее появляется надпись «соединительные растворы». Промывающий объем всегда составляет 3000 мл. Указывают это значение на экране. Стерильно соединяют сваркой 3000-мл мешок PlasmaLyte с трубкой, проходящей через зажим 1, в соответствии с примечанием к процессу 5.11. Подвешивают мешок с PlasmaLyte на штатив для внутривенных вливаний, помещая обе угловые петли мешка на крючок.

8.13.32 Убеждаются, что PlasmaLyte присоединен. Открывают все пластиковые зажимы. Убеждаются, что объем входящего раствора составляет 3000 мл. Нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется трафарет заправки одноразового набора. Убеждаются, что PlasmaLyte присоединен, и все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к PlasmaLyte, открыты, затем нажимают кнопку «да».

8.13.33 Наблюдают движение PlasmaLyte. Начинается заправка одноразового набора, и на дисплее появляется надпись «заправка одноразового набора». Визуально наблюдают, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком с PlasmaLyte. Если жидкость не двигается, нажимают кнопку «пауза» на экране и проверяют, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы нажимают кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки одноразового набора. После успешного завершения заправки одноразового набора появляется «подключение источника».

8.13.34-8.13.35 Следуют инструкциям на сенсорном дисплее LOVO.

8.13.36 Соединяют исходный контейнер с трубкой. Стерильно соединяют сваркой исходный мешок LOVO, подготовленный на этапе 8.12.31, с трубкой, проходящей через зажим S, в соответствии с примечанием к процессу 5.11. Может быть необходимо удалять трубку из зажима. ПРИМЕЧАНИЕ: убеждаются в повторном введении трубки исходного контейнера в зажим S, в случае ее удаления.

8.13.37 Подвешивают исходный контейнер. Подвешивают исходный контейнер на штатив для внутривенных вливаний, помещая обе угловые петли мешка на крючок. НЕ

подвешивают исходный контейнер на весы № 1. Открывают все зажимы на исходном мешке.

8.13.38 Убеждаются, что исходный контейнер присоединен. Нажимают кнопку «далее». На дисплее появляется трафарет заправки исходного контейнера. Убеждаются, что исходный контейнер соединен с одноразовым набором, и что все сварные швы и пластиковые зажимы на трубке, ведущей к исходному контейнеры, открыты. Нажимают кнопку «да».

8.13.39 Убеждаются, что PlasmaLyte движется. Начинается заправка исходного контейнера, и на дисплее появляется надпись «заправка исходного контейнера». Визуально наблюдают, как PlasmaLyte проходит через трубку, соединенную с мешком исходного контейнера. Если жидкость не движется, нажимают кнопку «пауза» на экране и проверяют, не остался ли закрытым зажим или сварной шов. После решения этой проблемы нажимают кнопку «возобновить» на экране для возобновления заправки исходного контейнера.

8.13.40 Надпись на дисплее «начало процедуры». После успешного завершения заправки исходного контейнера на дисплее появляется надпись «начало процедуры». Нажимают кнопку «старт», сразу после нажатия кнопки «старт» появляется экран для паузы «предварительная промывка, цикл 1».

8.13.41 Переворачивают используемый мешок. Снимают используемый мешок с весов № 2 (также можно удалять трубку из направляющей детали для трубки верхнего порта используемого мешка) и вручную переворачивают его, чтобы позволить промывающему буферу, добавленному на этапе заправки одноразового набора, покрыть все внутренние поверхности мешка. Вновь вешают используемый мешок на весы № 2 (этикетка на мешке направлена влево). Повторно устанавливают трубку верхнего порта в направляющую деталь для трубки, если она была удалена.

8.13.42 Переворачивают исходный мешок. Прежде, чем нажать кнопку «старт», перемешивают содержимое исходного мешка, не снимая его со штатива для внутривенных вливаний, путем разминания углов мешка и осторожного вращения для создания однородной клеточной суспензии. Нажимают кнопку «возобновить». LOVO начинает прокачивать жидкость из исходного мешка, и на дисплее появляется надпись «промывание, цикл 1».

8.13.43 Пауза для промывания исходного мешка. После того, как исходный контейнер опустошен, и LOVO добавил промывающий буфер в исходный мешок, появляется экран для паузы «промывание исходного контейнера». Не снимая исходный мешок со штатива для внутривенных вливаний, разминают углы мешка и тщательно перемешивают содержимое. Нажимают кнопку «возобновить».

8.13.44 Пауза для перемешивания используемого мешка. Для подготовки клеток к очередному проходу через вращающее устройство в используемый мешок добавляют промывающий буфер. После добавления промывающего буфера в используемый мешок LOVO автоматически делает паузу и появляется экран для паузы «перемешивание

используемого мешка». Не снимая мешок с весов, тщательно перемешивают содержимое, осторожно сжимая мешок. Нажимают кнопку «возобновить».

8.13.45 Пауза для разминания углов используемого мешка. После опустошения используемого мешка промывающий буфер добавляют через нижний порт используемого мешка для промывания мешка. После добавления промывающей жидкости LOVO автоматически делает паузу, и появляется экран для паузы «разминание углов ИМ». При появлении экрана для паузы «разминание углов ИМ» НЕ снимают мешок с весов № 2. С используемым мешком, все еще висящим на весах № 2, разминают углы мешка для перевода всех остаточных клеток в суспензию. Убеждаются, что мешок не качается на весах и нажимают кнопку «возобновить».

8.13.46 Ожидают появления надписи «удаление препаратов». После завершения процедуры LOVO на дисплее появляется 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».

8.13.47 Удаляют мешок ретентата. Помещают кровоостанавливающий зажим на трубку очень близко к порту на мешке ретентата, чтобы уберечь клеточную суспензию от оседания в трубке. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) ниже кровоостанавливающего зажима, убеждаясь, что остается линия достаточной длины до сварного шва на этапе 8.13.48. Удаляют мешок ретентата.

8.13.48 Готовят мешок ретентата для формулирования. Соединяют сваркой канюлю Люэра 4” набора для переливания плазмы с мешком ретентата. Переносят мешок ретентата в БББ для использования на этапе 8.14.11.

8.13.49 Удаляют препараты. Следуют инструкциям на дисплее по удалению препаратов. Закрывают все зажимы на наборе LOVO для предотвращения движения жидкости.

8.13.50 Удаляют препараты. Нажимают кнопку «далее». Открываются все механические зажимы LOVO и на дисплее появляется надпись «удаление набора».

8.13.51 Записывают данные. Следуют инструкциям на дисплее по удалению набора. Нажимают кнопку «далее». Закрываются все механические зажимы LOVO, и на дисплее появляется надпись «сводные результаты». Записывают данные с экрана «сводные результаты». Закрывают все насосы и фильтровальные устройства. Удаляют набор, когда соответствующие инструкции поступают от LOVO. *ПРИМЕЧАНИЕ: Все записываемые периоды времени записывают непосредственно с дисплея LOVO «сводные результаты» в формате ЧЧ:ММ:СС и (ЧЧ:ММ:СС) формате, когда это применимо.

8.13.52-8.13.54 Выбирают протокол в процессе выключения LOVO. Следуют инструкциям на дисплее LOVO.

8.13.55 Анализируют раздел 8.13

8.14 Окончательное формулирование и фасовка

8.14.1 Расчет целевого объема/мешок. На основании таблицы, приведенной ниже,

выбирают 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 из этапа 8.13.22.

Объем препарата LOVO	**Объем CS10 для добавления к препарату**	**Конечный прогнозируемый объем сформулированного препарата**	**Количество мешков для**	**Целевой объем заполнения на мешок**	**Удаляемый объем для архивного**	**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**

8.14.2 Готовят пустую пробу для CRF. Рассчитывают объем CS-10 и промывающего буфера LOVO для формулирования мешка пустой пробы.

Конечный целевой объем на мешок 8.14.1 E A	**Объем промывающего буфера LOVO для пустой пробы B=A/2**	**Объем CS-10 для пустой пробы (мл) C=B**
мл	мл	мл

8.14.3 Готовят пустую пробу для CRF. Вне БББ, используя шприц с промывающим буфером LOVO, приготовленным на этапе 8.11.29, добавляют объем, рассчитанный на этапе 8.14.2 B, в пустой мешок CS750 через крепление Люэра. ПРИМЕЧАНИЕ: препарат в мешке с пустой пробой CS750 не обязательно должен быть получен асептически.

8.14.4 Готовят пустую пробу для CRF. Используя шприц соответствующего размера, добавляют объем CS-10, рассчитанный на этапе 8.14.2, в тот же мешок CS750, приготовленный на этапе 8.14.3. Надевают красный колпачок на мешок CS750.

8.14.5 Готовят пустую пробу для CRF. Удаляют как можно больше воздуха из мешка CS-750. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) мешок CS750 как можно ближе к мешку, удаляя трубку.

8.14.6 Готовят пустую пробу для CRF. Маркируют мешок CS750 надписью «пустая проба для CRF», номером лота и инициалом/датой. Помещают пустую пробу CRF на охлаждающие пакеты до переноса ее в CRF.

8.14.7 Рассчитывают необходимый объем IL-2. Рассчитывают объем IL-2 для добавления к конечному препарату.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Конечный объем ретентата	Этап 8.13.51	A. мл
Конечный объем сформулированного препарата	B=A x 2	B. мл
Нужная конечная концентрация IL-2 (МЕ/мл)	300 МЕ/мл	C. 300 МЕ/мл

Необходимое количество МЕ IL-2	D=B x C	D. МЕ
Рабочий маточный раствор IL-2 из этапа 8.11.33	6×10^4 МЕ/мл	E. 6×10^4 МЕ/мл
Объем IL-2 для добавления к конечному препарату	F=D ÷ E	F. мл

8.14.8 Собирают соединительное устройство. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) 4S-4M60 с CC2 Cell Connect, заменяя одну иглу устройства Cell Connect (B) 4-игольным концом разветвленного трубопровода 4S-4M60 в (G). (Смотри, например, Фигуру 135.)

8.14.9 Собирают соединительное устройство. Стерильно соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) криомешки CS750 с набором принадлежностей, приготовленным на этапе 8.14.8, заменяя один из четырех конусов Люэра (E) на каждый мешок. Сверяются с этапом 8.14.1 для определения необходимого количества мешков. (Смотри, например, Фигуру 136.)

8.14.10 Собирают соединительное устройство. Соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) мешки CS-10 с иглами 4S-4M60. Продолжают охлаждать CS-10 за счет помещения мешков между двумя охлаждающими пакетами, имеющими температуру 2-8°C. (Смотри, например, Фигуру 137.)

8.14.11 Переносят материалы в БББ.

Предмет	**№ предмета или ссылка на этап**	**Количество**
4” набор для переливания плазмы		1
Аликвота IL-2 ($6{,}0\times10^4$)	8.11.33	1
Соответствующего размера шприц для добавления IL2	8.14.7 F	1
Мешок ретентата LOVO	8.13.48	1
Красные колпачки		5

8.14.12 Готовят ОИЛ с IL-2. Используя шприц соответствующего размера, отбирают количество IL-2, определенное на этапе 8.14.7, из аликвоты «IL-2 6×10^4».

8.14.13 Готовят ОИЛ с IL-2. Соединяют шприц с мешком ретентата, приготовленным на этапе 8.13.48, через крепление Люэра, и инъецируют IL-2.

8.14.14 Готовят ОИЛ с IL-2. Очищают линию путем проталкивания воздуха из шприца через линию.

8.14.15 Маркируют мешок со сформулированными ОИЛ. Закрывают зажим на наборе для перекачивания жидкости, маркируют мешок надписью «сформулированные ОИЛ» и выносят мешок из ББББ.

8.14.16 Если применимо: отбирают образец в соответствии с планом сбора образцов. Если остается аликвота «IL-2 6×10^4», приготовленная на этапе 8.11.33, отбирают архивный образец ~5 мл в соответствии с планом сбора образцов, используя шприц

соответствующего размера, и вносят в 50-мл коническую пробирку.

8.14.17 Если применимо: отбирают образец в соответствии с планом сбора образцов. Маркируют образец этикеткой в соответствии с перечнем образцов и хранят при 2-8°C до передачи в Login для тестирования в соответствии с планом сбора образцов.

8.14.18 Если применимо: отбирают образец в соответствии с планом сбора образцов. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.14.19 Добавляют мешок со сформулированными ОИЛ в устройство. После добавления IL-2 соединяют сваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.11) мешок «сформулированные ОИЛ» с оставшейся иглой (A) на устройстве, приготовленном на этапе 8.14.10. (Смотри, например, Фигуру 138.)

8.14.20 Добавляют CS10. Переносят собранное устройство с подсоединенными мешками со сформулированными ОИЛ, CS-750 и CS-10 в ББВ. ПРИМЕЧАНИЕ: мешок CS-10 и все мешки CS-750 помещают между двумя охлаждающими пакетами, предварительно охлажденными до 2-8°C. Не помещают мешок со сформулированными ОИЛ на охлаждающие пакеты.

8.14.21 Добавляют CS10. Убеждаются, что все зажимы на устройстве закрыты. Поворачивают запорный клапан так, чтобы шприц был закрыт.

8.14.22 Заменяют шприцы. Набирают ~10 мл воздуха в 100-мл шприц и заменяют 60-мл шприц на устройстве.

8.14.23 Добавляют CS10. Поворачивают запорный клапан так, чтобы линия к мешкам CS750 была закрыта. Открывают зажимы к мешкам CS-10 и набирают объем, рассчитанный на этапе 8.14.1 B, в шприц. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для добавления соответствующего объема CS-10. ПРИМЕЧАНИЕ: записывают объем из каждого шприца на этапе 8.14.26.

8.14.24 Добавляют CS10. Закрывают зажимы к CS-10, открывают зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ и добавляют CS-10. ПРИМЕЧАНИЕ: добавляют сначала 10,0 мл CS10 со скоростью примерно 10,0 мл/минуту. Добавляют остаток CS-10 с соответствующей скоростью 1,0 мл /сек. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для добавления соответствующего объема CS-10. После опустошения шприца его не используют повторно.

8.14.25 Добавляют CS10. Записывают время. ПРИМЕЧАНИЕ: целевой отрезок времени с момента первого добавления CS-10 до начала заморозки составляет 30 минут.

8.14.26 Добавляют CS10. Записывают каждый добавленный объем CS10 и общий добавленный объем. Общий объем соответствует объему, рассчитанному на этапе 8.14.1 B.

8.14.27 Добавляют CS10. Закрывают все зажимы к мешкам CS10.

8.14.28 Готовят мешки CS-750. Поворачивают запорный клапан так, чтобы шприц был открыт. Открывают зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ и отбирают суспензию, останавливаясь непосредственно перед тем, как суспензия достигает

запорного клапана.

8.14.29 Готовят мешки CS-750. Закрывают зажимы к мешку со сформулированными ОИЛ. Поворачивают запорный клапан так, чтобы он был открыт в сторону пустых мешков CS750 для конечного препарата.

8.14.30 Готовят мешки CS-750. Используя новый шприц, отбирают как можно больше воздуха из мешков CS750 для конечного препарата, вытягивая воздух. Поддерживая давление на поршень шприца, закрывают зажимами мешки.

8.14.31 Готовят мешки CS-750. Набирают ~20 мл воздуха в новый 100-мл шприц и соединяют с устройством. ПРИМЕЧАНИЕ: каждый мешок CS-750 для конечного препарата должен находиться между двумя охлаждающими пакетами для поддержания суспензии сформулированных ОИЛ холодной.

8.14.32 Вносят клетки. Поворачивают запорный клапан так, чтобы линия к мешкам с конечным препаратом была закрыта. Отбирают объем, рассчитанный на этапе 8.14.1, из мешка со сформулированными ОИЛ в шприц. ПРИМЕЧАНИЕ: можно использовать несколько шприцев для получения нужного объема.

8.14.33 Вносят клетки. Поворачивают запорный клапан так, чтобы линия к мешку со сформулированными ОИЛ была закрыта. Работая каждый раз с одним мешком для конечного препарата, вносят клетки в мешок для конечного препарата. Записывают объем клеток, добавленный в каждый из мешков CS750 на этапе 8.14.35.

8.14.34 Вносят клетки. Очищают линию воздухом из шприца так, чтобы клетки были вровень с верхом игольного порта. Закрывают зажим на заполненном мешке. Повторяют этап 8.14.29 - этап 8.14.34 с каждым мешком для конечного препарата, в промежутках осторожно перемешивая содержимое мешков со сформулированными ОИЛ.

8.14.35 Вносят клетки. Записывают объем ОИЛ, помещенный в каждый мешок для конечного препарата.

8.14.36 Удаляют воздух из мешков для конечного препарата и отбирают архивный образец. После заполнения последнего мешка для конечного препарата закрывают все зажимы.

8.14.37 Удаляют воздух из мешков для конечного препарата и отбирают архивный образец. Набирают 10 мл воздуха в новый 100-мл шприц и заменяют шприц на устройстве.

8.14.38 Удаляют воздух из мешков для конечного препарата и отбирают архивный образец. Работая каждый раз с одним мешком, отбирают весь воздух из каждого мешка с препаратом плюс объем препарата для архивного образца, определенный на этапе 8.14.1 D. ПРИМЕЧАНИЕ: после отбора объема образца переворачивают шприц и используют воздух для очистки линии к верхнему порту на мешке для препарата. Закрывают зажимом линию к мешку после отбора объема архивного образца и удаления воздуха.

8.14.39 Записывают отобранный объем. Записывают объем архивного образца, отобранный из каждого мешка.

8.14.40 Вносят архивный образец. Помещают архивный образец в 50-мл

коническую пробирку, и маркируют пробирку надписью «архивный образец» и номером лота. Повторяют этап 8.14.37 - этап 8.14.39 для каждого мешка.

8.14.41 Готовят конечный препарат для криоконсервирования. Используя кровоостанавливающий зажим, зажимают линии близко к мешкам. Удаляют шприц и закрывают красным колпачком крепление Люэра на устройстве, в котором находится шприц. Извлекают устройство из БББ.

8.14.42 Готовят конечный препарат для криоконсервирования. Запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) в F, удаляя пустой мешок ретентата и мешки CS-10. ПРИМЕЧАНИЕ: сохраняют крепление Люэра для шприца на устройстве. Выбрасывают пустые мешки для ретентата и CS-10. (Смотри, например, Фигуру 139.)

8.14.43 Проводят визуальную инспекцию. ПРИМЕЧАНИЕ: действия этапа 8.14.43 – этапа 8.14.46 можно выполнять параллельно с действиями этапа 8.14.47 - этапа 8.14.68.

8.14.44 Маркируют конечный препарат. Маркируют мешки для конечного препарата. Прикрепляют этикетку к мешкам для конечного препарата.

8.14.45 Готовят конечный препарат для криоконсервирования. Хранят криомешки на охлаждающем пакете или при 2-8°C до криоконсервирования.

8.14.46 Готовят внешние этикетки. Убеждаются, что выпущенные КК внешние этикетки, которые будут прикреплены к кассетам, согласуются с соответствующей этикеткой для конечного препарата. Прикрепляют выпущенные КК внешние этикетки к кассетам. Прикрепляют иллюстративную этикетку, приведенную ниже.

8.14.47 Отбирают образец для подсчета клеток. Используя пипетку соответствующего размера, отбирают 2,0 мл архивного образца, извлеченного на этапе 8.14.38, и помещают в 15-мл коническую пробирку для использования при подсчете клеток.

8.14.48 Выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 в соответствии с СОП-00314 и примечанием к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавляют только один образец до соответствующего разведения, чтобы убедиться, что разведение было достаточным. Разбавляют дополнительные образцы с соответствующим коэффициентом разведения и продолжают процедуру подсчета.

8.14.49 Записывают объемы образцов для подсчета клеток. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.14.50 Определяют мультипликативный множитель

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.14.49 A+8.14.49 B	C. мкл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.14.49 A	D.

8.14.51 Выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток»,

введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя в соответствии с СОП – 00314. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.14.52 Записывают название файла, результаты определения жизнеспособности и количества клеток из Nucleoview.

8.14.53 Определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Жизнеспособность	(8.14.52 A+8.14.52 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.14.52 C+8.14.52 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.14.54 Определяют верхний и нижний пределы для количества клеток.

Параметр	**Формула**	**Результат**
Нижний предел	8.14.53 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.14.53 F x 1,1	H. клеток/мл

8.14.55 Находятся ли оба количества в приемлемых пределах?

Параметр	**Формула**	**Результат (Да/Нет)**
Нижний предел	8.14.52 C и D ≥ 8.14.54 G	
Верхний предел	8.14.52 C и D ≤ 8.14.54 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», выполняют вторую серию подсчетов на этапах 8.14.56–8.14.63.

8.14.56 Если применимо: выполняют подсчет клеток. Выполняют подсчет клеток и расчеты, используя NC-200 в соответствии с СОП-00314 и примечанием к процессу 5.14. ПРИМЕЧАНИЕ: разбавление можно корректировать, исходя из ожидаемой концентрации клеток.

8.14.57 Если применимо: записывают объемы образцов для подсчета клеток.

8.14.58 Если применимо: определяют мультипликативный множитель

Параметр	**Формула**	**Результат**
Общий объем образцов для подсчета клеток	8.14.57 A+8.14.57 B	C. мл
Мультипликативный множитель	C ÷ 8.14.57 A	D.

8.14.59 Если применимо: выбирают протоколы и вводят мультипликативные множители. Убеждаются, что выбран протокол «анализ для подсчета жизнеспособных клеток», введены все мультипликативные множители, а также объемы образцов и разбавителя. ПРИМЕЧАНИЕ: если в разведении нет необходимости, вводят «образец [мкл]» = 200, «разведение [мкл]» = 0.

8.14.60 Если применимо: записывают количества клеток из Nucleoview.

8.14.61 Если применимо: определяют средние значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	(8.14.60 A+8.14.60 B) ÷ 2	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	(8.14.60 C+8.14.60 D) ÷ 2	F. клеток/мл

8.14.62 Если применимо: определяют верхний и нижний пределы для количества клеток.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.14.61 F x 0,9	G. клеток/мл
Верхний предел	8.14.61 F x 1,1	H. клеток/мл

8.14.63 Если применимо: находятся ли количества в приемлемых пределах?

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.14.60 C и D ≥ 8.14.62 G	
Верхний предел	8.14.60 C и D ≤ 8.14.62 H	

ПРИМЕЧАНИЕ: если в любом случае ответ «нет», переходят к этапу 8.14.64 для определения среднего количества.

8.14.64 Если применимо: определяют среднюю концентрацию жизнеспособных клеток на основании всех четырех проведенных подсчетов.

8.14.65 Выполняют расчеты для образца для проточной цитометрии. Выполняют расчеты, чтобы подтвердить достаточную концентрацию клеток для тестирования образца методом проточной цитометрии.

Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.14.53 F* или этапа 8.14.61 F* или этапа 8.14.64 E* A	**Целевой объем, необходимый для 6×10^7 ОКЖК B=6×10^7 клеток/A**	**B ≤1,0 мл? (Да/Нет**)**
клеток/мл	мл	

*Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения концентрации жизнеспособных клеток. **ПРИМЕЧАНИЕ: если ответ «нет», сообщают территориальному менеджменту.

8.14.66 Рассчитывают количество IFN-γ. Выполняют расчеты, чтобы подтвердить достаточную концентрацию клеток для тестирования образца на IFN-γ.

Концентрация жизнеспособных клеток из этапа 8.14.53 F* или этапа 8.14.61 F*	**Объем, необходимый для минимум $1,5\times10^7$ ОКЖК B=$1,5\times10^7$ клеток/A**	**B ≤1,0 мл? (Да/Нет**)**

или этапа 8.14.64 E* **A**		
клеток/мл	мл	

*Обводят кружком ссылку на этап, используемый для определения концентрации жизнеспособных клеток. **ПРИМЕЧАНИЕ: если ответ «нет», сообщают территориальному менеджменту.

8.14.67 Составляют отчет о результатах. Заполняют формы для подачи с образцами.

8.14.68 Запечатывают термосваркой. После определения объемов образцов запечатывают термосваркой (в соответствии с примечанием к процессу 5.12) мешки для конечного препарата как можно ближе к мешкам, для извлечения их из устройства.

8.14.69 Маркируют и собирают образцы в соответствии с планом сбора образцов.

Образец	**Количество контейнеров**	**Объем образца для добавления в каждый контейнер**	**Тип контейнера**	**Назначение**
*Микоплазма	1	1,0 мл	15-мл коническая пробирка	Login
Эндотоксин	2	1,0 мл	2-мл криопробирка	Login
Окраска по Грамму	1	1,0 мл	2-мл криопробирка	Login
IFN-γ	1	1,0 мл	2-мл криопробирка	Login
Проточная цитометрия	1	1,0 мл	2-мл криопробирка	Login
**Bac-T стерильность	2	1,0 мл	Bac-T флакон	Login
Архивный образец для КК	4	1,0 мл	2-мл криопробирка	Login
Сателлитные флаконы	10	0,5 мл	2-мл криопробирка	Login

*ПРИМЕЧАНИЕ: для получения образца для анализа микоплазмы добавляют объем сформулированной клеточной суспензии в 15-мл коническую пробирку, маркированную надписью «разбавитель для анализа микоплазмы» из этапа 8.12.55.

**ПРИМЕЧАНИЕ: переходят к этапу 8.14.70 для инокуляции Bac-T.

8.14.70 Стерильность и Bac-T. Отбор образцов для анализа. В БББ отбирают 1,0-мл образец из архивного образца клеточной суспензии, собранного на этапе 8.14.38, используя шприц соответствующего размера, и инокулируют в анаэробный флакон. Повторяют описанную выше процедуру для аэробного флакона. ПРИМЕЧАНИЕ: хранят

флаконы для Bac-T при комнатной температуре и защищенными от света.

8.14.71 Маркируют и хранят образцы. Маркируют все образцы инвентарными этикетками в соответствии с планом сбора образцов и хранят надлежащим образом до передачи в Login. ПРИМЕЧАНИЕ: переходят к действиям раздела 8.15 для криоконсервирования конечного препарата и образцов.

8.14.72 Регистрируют взятие образца. Убеждаются в заполнении рабочего листа LIMS в соответствии с планом сбора образцов для извлечения образца.

8.14.73 Передача образцов. Передают все образцы для тестирования, собранные в день 22, в Login.

8.14.74 Мониторинг окружающей среды. После обработки проверяют, чтобы был произведен мониторинг ББВ и персонала.

8.14.75 Анализируют раздел 8.14

8.15 Криоконсервирование конечного препарата

8.15.1 Готовят морозильную камеру с регулируемой скоростью заморозки. Подтверждают настройки CRF перед замораживанием. Записывают информацию об оборудовании CRF. Выполняют криоконсервирование.

8.15.2 Настройка датчиков CRF. Прокалывают перегородку на мешке с пустой пробой для CRF. Вставляют 6-мл ампулу температурного датчика.

8.15.3 Помещают конечный препарат и образцы в CRF. Помещают мешок с пустой пробой в предварительно охлажденную кассету и переносят примерно в середину штатива CRF. Переносят кассеты с конечным препаратом в штатив CRF, и пробирки в штатив для пробирок CRF.

8.15.4 Помещают конечный препарат и образцы в CRF. Переносят штативы с препаратом и штативы с пробирками в CRF. Записывают время переноса препарата в CRF и температуру камеры на этапе 8.15.5. ПРИМЕЧАНИЕ: равномерно распределяют кассеты и штативы с пробирками в CRF, оставляя как можно больше пространства между полками.

8.15.5 Определяют время, необходимое для достижения температуры 4°C ± 1,5°C, и продолжают процесс в CRF. После того, как температура камеры достигает 4°C ± 1,5°C, начинают процесс заморозки. Записывают время.

Параметр	**Формула**	**Значение**
Время помещения конечного препарата в CRF	(ЧЧММ)	
Температура, при которой конечный препарат помещен в CRF	С монитора	°C
B. Время начала процесса в CRF	(ЧЧММ)	
Время, прошедшее с формулирования до начала процесса в CRF	C=B – время этапа 8.14.25 A	мин

8.15.6 Завершают процесс и хранят препараты. Останавливают CRF после завершения процесса заморозки. Извлекают кассеты и пробирки из CRF. Переносят

кассеты и пробирки на хранение в паровую фазу LN_2. Записывают местонахождение в хранилище.

РЕЗЮМЕ ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОБРАБОТКИ

Последующая обработка: Конечный лекарственный препарат

- (День 22) Определение CD3+ клеток в день 22 ПБР методом проточной цитометрии

- (День 22) Окрашивание по Граму (GMP)

- (День 22) Анализ на бактериальный эндотоксин гель-тромб методом с лизатом амебоцитов мечехвоста (GMP)

- (День 16) Анализ стерильности BacT (GMP)

- (День 16) Обнаружение ДНК микоплазмы методом TD-ПЦР (GMP)

- Приемлемые внешние атрибуты (этап 8.14.43)

- (День 22) Анализ стерильности BacT (GMP)

- (День 22) Анализ IFN-гамма.

[001037] 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.

[001038] 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.

[001039] 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.

[001040] 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.

Последовательности:

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

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

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

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность альдеслейкина.

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

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

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

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

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 TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 2	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60

(Муромона б легкая цепь)	FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

Аминокислотные последовательности интерлейкинов

Название	**Последовательность (однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO: 3 рекомбинантный человеческий IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO: 4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO: 5 рекомбинантный человеческий IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO: 6 рекомбинантный человеческий IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTOИЛ LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO: 7 рекомбинантный человеческий IL-15	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115

(rhIL-15)	
SEQ ID NO: 8 рекомбинантный человеческий IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) в терапевтическую популяцию ОИЛ, включающий:

(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, и, необязательно, OKT-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, с получением 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 (a) к этапу (b) происходит без открывания системы;

(c) проведение второго размножения путем добавления в среду для культивирования клеток второй популяции ОИЛ дополнительного IL-2, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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 (c) происходит без открывания системы;

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

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

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что терапевтическая популяция ОИЛ, собранная на этапе (d), содержит достаточное количество ОИЛ для терапевтически эффективной дозы ОИЛ.

3. Способ по п. 2, при этом количество ОИЛ, достаточное для терапевтически эффективной дозы, составляет от примерно $2{,}3\times10^{10}$ до примерно $13{,}7\times10^{10}$.

4. Способ по п. 3, дополнительно включающий этап криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ОИЛ, с использованием способа криоконсервирования.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что способ криоконсервирования применяют с использованием соотношения 1:1 собранной популяции ОИЛ и среды для криоконсервирования.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что антигенпредставляющие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что МКПК являются облученными и аллогенными.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что МКПК добавляют к культуре клеток в любой из дней 9-14 на этапе (c).

9. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антигенпредставляющие клетки представляет собой искусственные антигенпредставляющие клетки.

10. Способ по п. 1, отличающийся тем, что сбор клеток на этапе (d) проводят с использованием системы обработки клеток LOVO.

11. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают от примерно 4 до примерно 50 фрагментов, при этом каждый фрагмент имеет объем примерно 27 $мм^3$.

12. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают от примерно 30 до примерно 60 фрагментов с общим объемом от примерно 1300 $мм^3$ до примерно 1500 $мм^3$.

13. Способ по п. 2, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 $мм^3$.

14. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают примерно 50 фрагментов с общей массой от примерно 1 грамма до примерно 1,5 граммов.

15. Способ по п. 1, при этом множество фрагментов включают примерно 4 фрагмента.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что вторая среда для культивирования клеток находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культивирования клеток Xuri™.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что инфузионный мешок на этапе (e) представляет собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 10 дней, 11 дней или 12 дней.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что каждый из первого периода на этапе (b) и второго периода на этапе (c) проводят в течение 11 дней.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 22 дней.

21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 20 дней.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этапы (a) - (e) проводят в течение периода времени от примерно 10 дней до примерно 15 дней.

23. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этапы (a) - (e) проводят в течение 22 дней или менее.

24. Способ по п. 4, отличающийся тем, что этапы (a) - (e) и криоконсервирование проводят в течение 22 дней или менее.

25. Способ по любому из пунктов 1-24, отличающийся тем, что 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.

26. Способ по любому из пунктов 1-25, отличающийся тем, что

антигенпредставляющие клетки добавляют к ОИЛ в течение второго периода на этапе (c) без открывания системы.

27. Способ по любому из пунктов 1-26, отличающийся тем, что третья популяция ОИЛ на этапе (d) представляет собой терапевтическую популяцию ОИЛ, содержащую увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти в сравнении со второй популяцией ОИЛ, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, обладают одной или более характеристиками, выбранными из группы, состоящей из экспрессии CD27+, экспрессии CD28+, более длинных теломер, повышенной экспрессии CD57 и сниженной экспрессии CD56, в сравнении с эффекторными Т-клетками, и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

28. Способ по любому из пунктов 1-27, при этом эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ОИЛ, демонстрируют повышенную экспрессию CD57 и сниженную экспрессию CD56 в сравнении с эффекторными Т-клетками и/или центральными Т-клетками памяти, полученными из второй популяции клеток.

29. Способ по любому из пунктов 1-28, отличающийся тем, что риск микробного загрязнения снижен в сравнении с открытой системой.

30. Способ по любому из пунктов 1-29, при этом ОИЛ из этапа (e) вводят инфузией пациенту.

31. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что закрытый контейнер представляет собой одиночный биореактор.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что закрытый контейнер представляет собой G-REX 10.

33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что закрытый контейнер представляет собой G-REX 100.

34. Способ по любому из пунктов 1-33, отличающийся тем, что на этапе (d) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что культура клеток имеет соотношение, составляющее 2,5×109 АПК к 100×10^6 ОИЛ.

36. Способ по любому из пунктов 1-33, отличающийся тем, что на этапе (c) антигенпредставляющие клетки (АПК) добавляют к культуре клеток второй популяции ОИЛ в соотношении АПК:ОИЛ, составляющем от 25:1 до 100:1.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что культура клеток имеет соотношение, составляющее $2,5\times10^9$ АПК к 100×10^6 ОИЛ.

38. Популяция размноженных ОИЛ для использования в лечении субъекта, страдающего от рака, представляющая 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 IL-2, и, необязательно, OKT-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, с получением 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, необязательно, OKT-3 и антигенпредставляющих клеток (АПК), с получением третьей популяции ОИЛ, при этом второе размножение проводят в течение примерно 7-14 дней, с получением 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) сбор терапевтической популяции ОИЛ, полученной на этапе (d), при этом переход от этапа (d) к этапу (e) происходит без открывания системы; и

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

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

39. Популяция ОИЛ по п. 38, при этом способ получения ОИЛ дополнительно включает один или более признаков, перечисленных в любом из пунктов 1-37.

40. Композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ОИЛ по п. 38, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов.

41. Композиция для криоконсервирования по п. 40, дополнительно содержащая один или более стабилизаторов и один или более факторов роста лимфоцитов.

42. Композиция для криоконсервирования по п. 41, при этом один или более стабилизаторов включают человеческий сывороточный альбумин (ЧСА), и один или более факторов роста лимфоцитов включают IL-2.

43. Композиция для криоконсервирования по п. 42, необязательно, содержащая OKT-3.

44. Композиция для криоконсервирования по п. 40, отличающаяся тем, что криопротекторная среда, содержащая ДМСО, и раствор электролитов присутствуют в соотношении от примерно 1,1:1 до примерно 1:1,1.

45. Композиция для криоконсервирования по п. 44, отличающаяся тем, что криопротекторная среда, содержащая ДМСО, и раствор электролитов присутствуют в соотношении примерно 1:1.

46. Композиция для криоконсервирования по п. 40, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^6 до примерно 9×10^{14}; криопротекторную среду, содержащую ДМСО, в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,1 г до примерно 1,0 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,005 мг.

47. Композиция для криоконсервирования по п. 40, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

48. Композиция для криоконсервирования по п. 40, при этом 100 мл композиции состоят преимущественно из популяции ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторной среды в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствора электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

49. Применение композиции для криоконсервирования по п. 40 для лечения субъекта, страдающего от рака.

50. Композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ОИЛ, криопротекторную среду, содержащую диметилсульфоксид (ДМСО), и раствор электролитов, при этом 100 мл композиции содержат популяцию ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторную среду в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда содержит примерно 10% ДМСО; раствор электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно 0,003 мг.

51. Композиция для криоконсервирования, состоящая преимущественно из популяции ОИЛ, криопротекторной среды, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО), и раствора электролитов, при этом 100 мл композиции состоят преимущественно из популяции ОИЛ в количестве от примерно 1×10^7 до примерно 1×10^{11}; криопротекторной среды в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл, при этом криопротекторная среда состоит преимущественно из примерно 10% ДМСО; раствора электролитов в количестве от примерно 30 мл до примерно 70 мл; ЧСА в количестве от примерно 0,3 г до примерно 0,7 г; и IL-2 в количестве от примерно 0,001 мг до примерно

0,003 мг.

52. Инфузионный мешок, содержащий композицию для криоконсервирования по любому из пунктов 40-51.

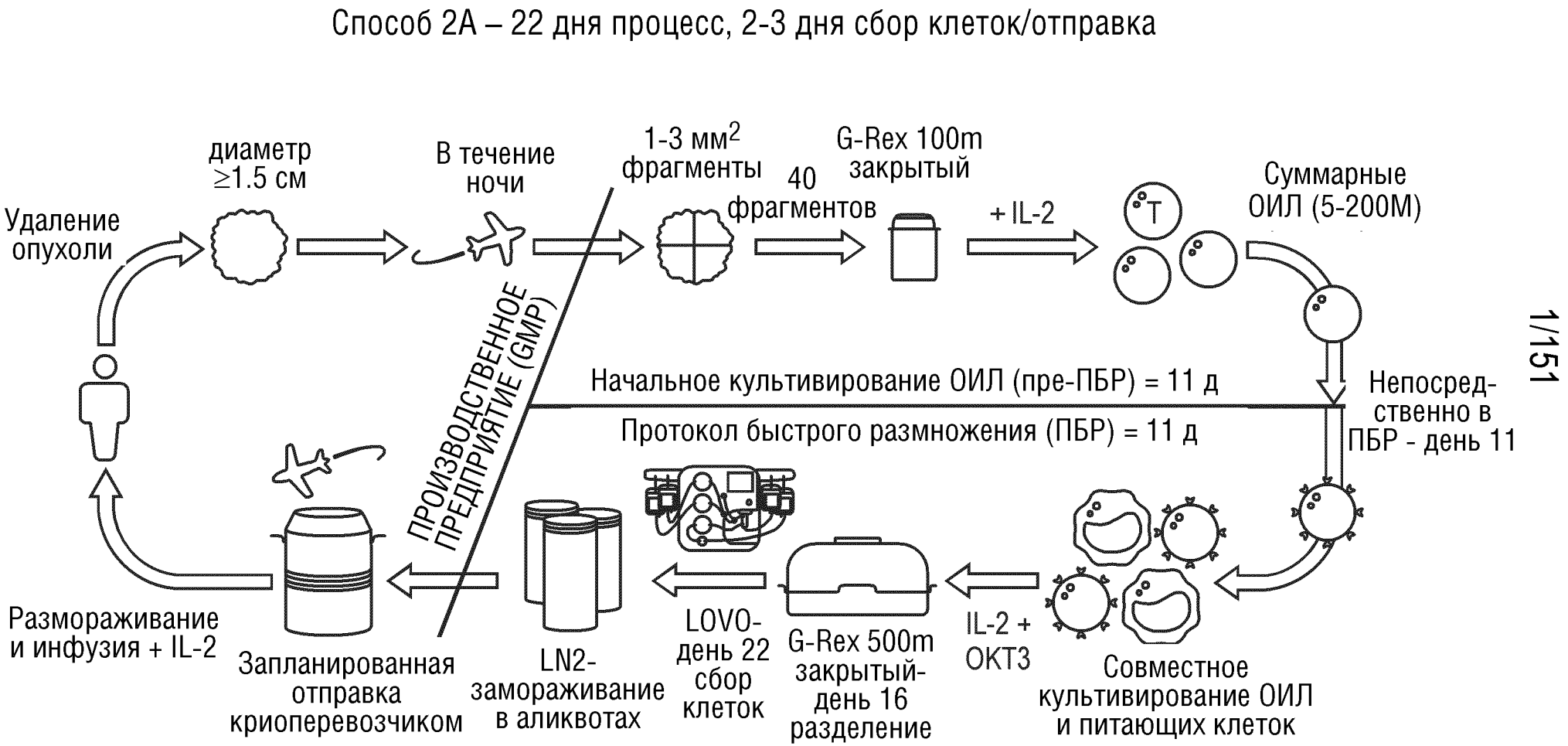
53. Инфузионный мешок по п. 52, представляющий собой HypoThermosol-содержащий инфузионный мешок.

54. Мешок для хранения, содержащий композицию для криоконсервирования по любому из пунктов 40-51.

55. Мешок для хранения по п. 54, представляющий собой мешок для заморозки CryoStore CS750.

По доверенности

ФИГ.1



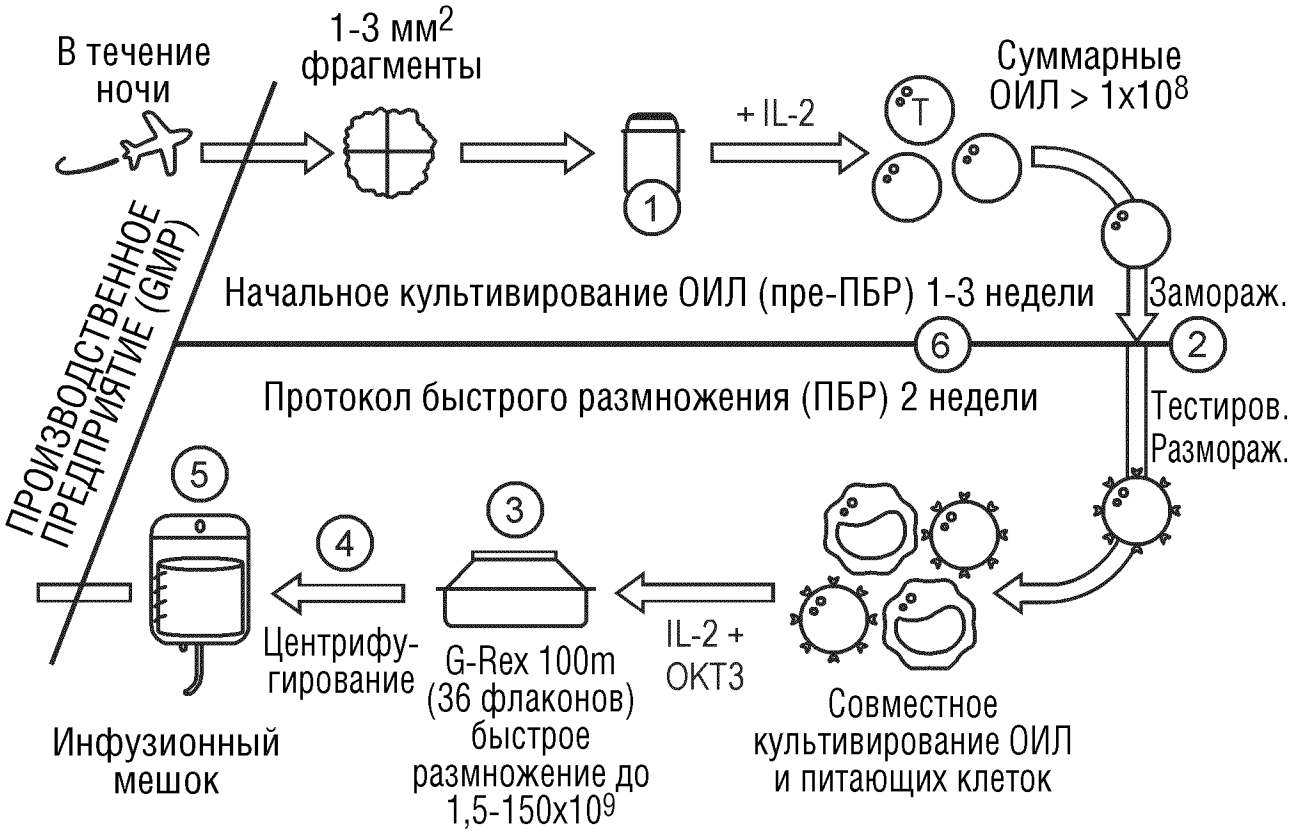
1/151

564962

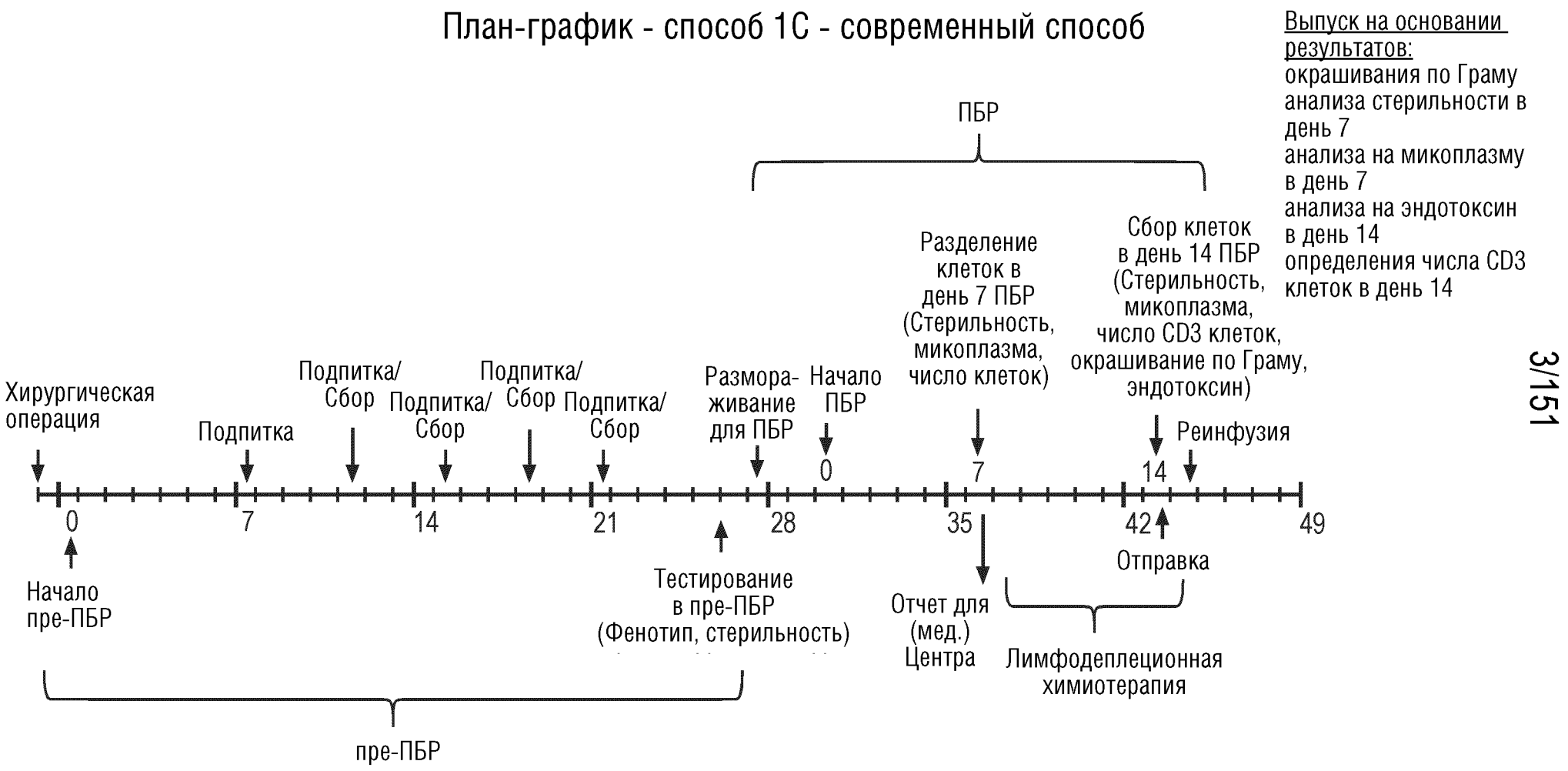
ФИГ.2

Разработка процесса

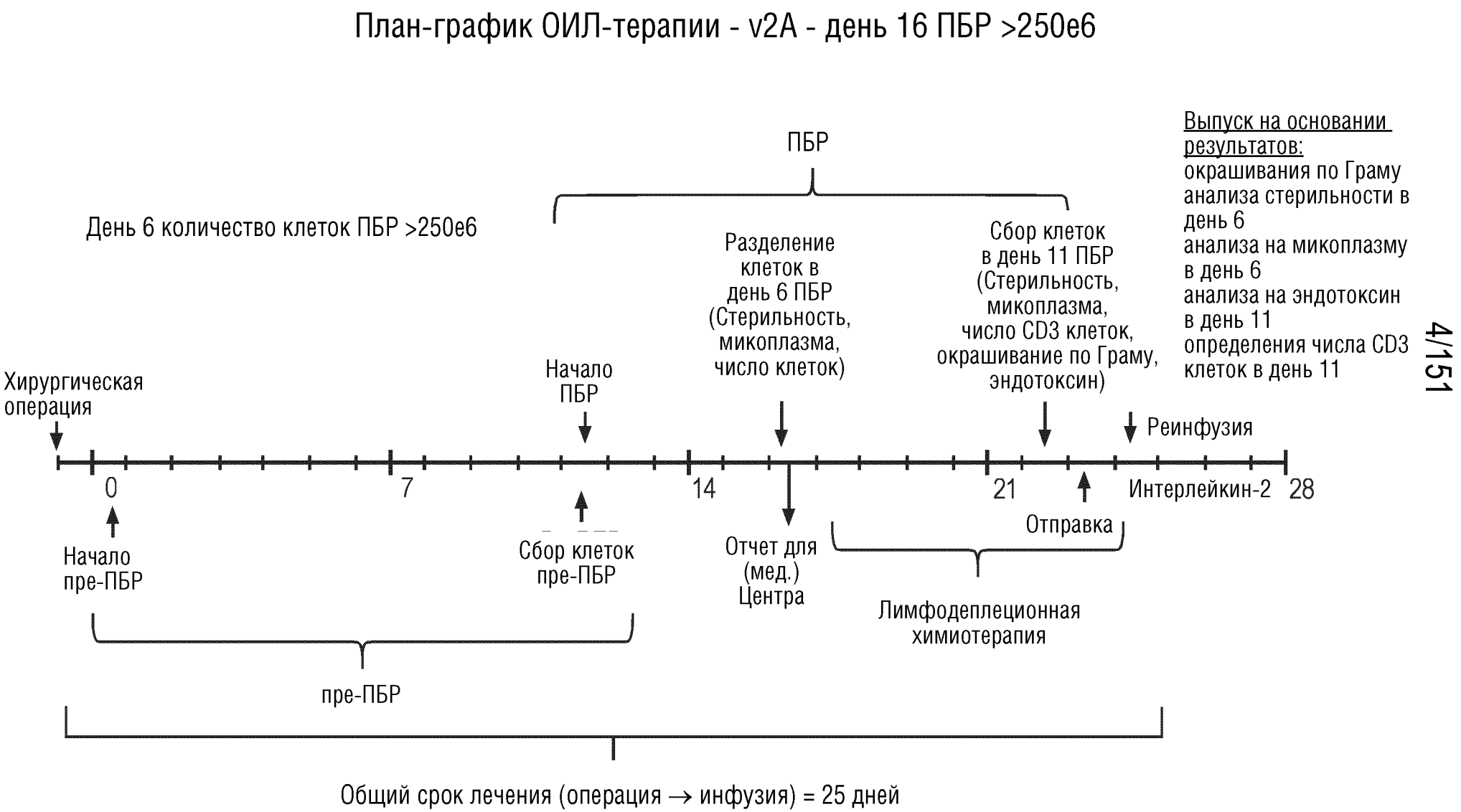
Этап	Современный способ-1С	Новый способ-2А	Изменение
1	4 фрагмента/10 G-Rex 10-21 день	40 фрагментов/1-G-Rex 100 CS- (x2?) 11 дней	Больше образцов опухоли/ контейнер, сокращение времени культивирования, сокращение количества этапов, Возможность использования с закрытой системой
2	Пре-ПБР замораживание-> 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-CSIO 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

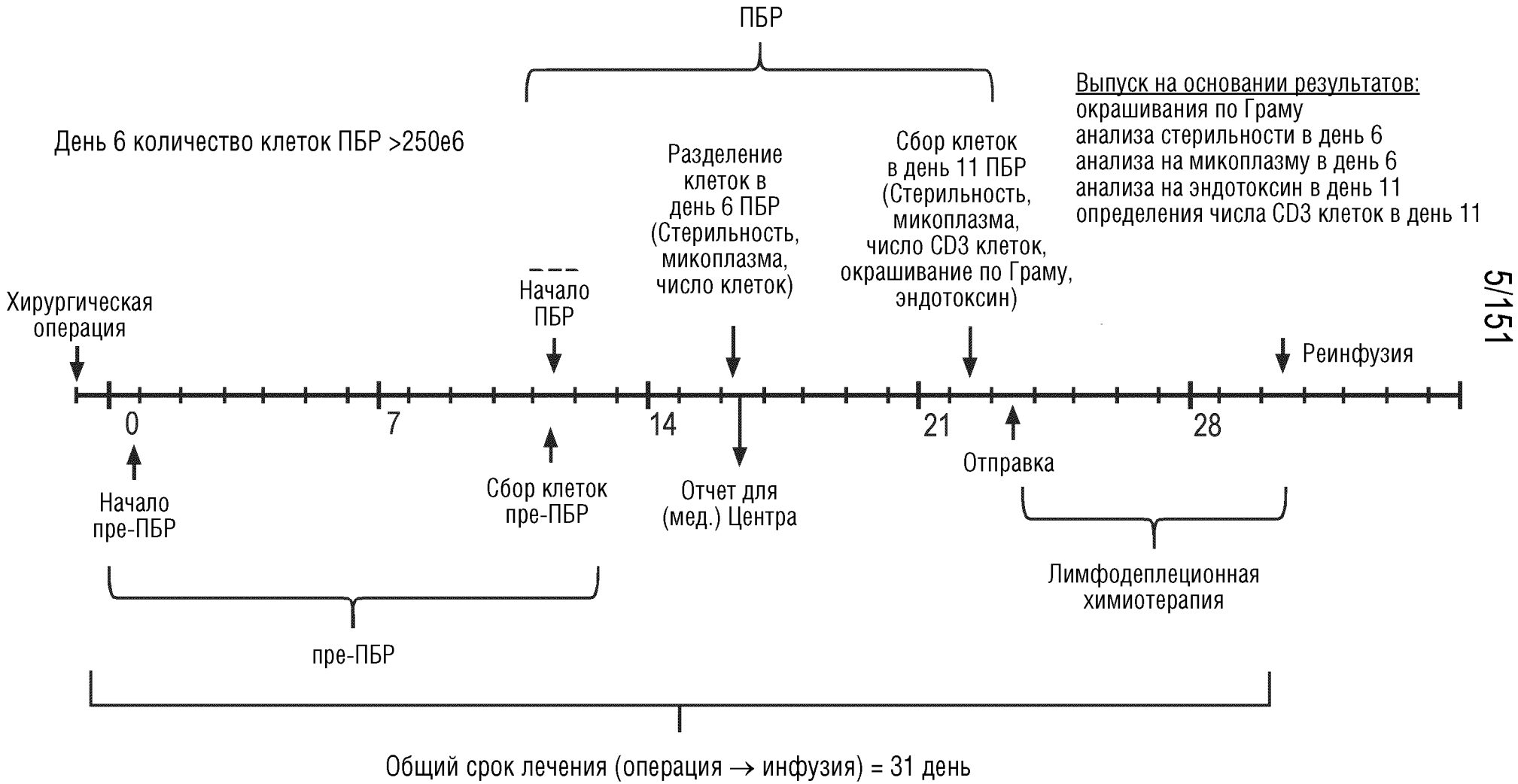

План-график - способ 1С - современный способ
Выпуск на основании результатов:
окрашивания по Граму
анализа стерильности в день 7
анализа на микоплазму в день 7
анализа на эндотоксин в день 14
определения числа CD3 клеток в день 14
ПБР
Разделение клеток в день 7 ПБР (Стерильность, микоплазма, число клеток)
Сбор клеток в день 14 ПБР (Стерильность, микоплазма, число CD3 клеток, окрашивание по Граму, эндотоксин)
Хирургическая операция
Подпитка
Подпитка/ Сбор
Подпитка/ Сбор
Подпитка/ Сбор
Подпитка/ Сбор
Размора-живание для ПБР
Начало ПБР
Реинфузия
0
7
14
21
28
0
7
14
35
42
49
Начало пре-ПБР
Тестирование в пре-ПБР (Фенотип, стерильность)
Отчет для (мед.) Центра
Отправка
Лимфодеплеционная химиотерапия
пре-ПБР

ФИГ.4


План-график ОИЛ-терапии - v2A - день 16 ПБР >250e6
ПБР
Выпуск на основании результатов:
окрашивания по Граму анализа стерильности в день 6
анализа на микоплазму в день 6
анализа на эндотоксин в день 11
определения числа CD3 клеток в день 11
День 6 количество клеток ПБР >250e6
Разделение клеток в день 6 ПБР (Стерильность, микоплазма, число клеток)
Сбор клеток в день 11 ПБР (Стерильность, микоплазма, число CD3 клеток, окрашивание по Граму, эндотоксин)
Хирургическая операция
Начало ПБР
Реинфузия
0
7
14
21
28
Интерлейкин-2
Отправка
Начало пре-ПБР
Сбор клеток пре-ПБР
Отчет для (мед.) Центра
Лимфодеплеционная химиотерапия
пре-ПБР
Общий срок лечения (операция → инфузия) = 25 дней

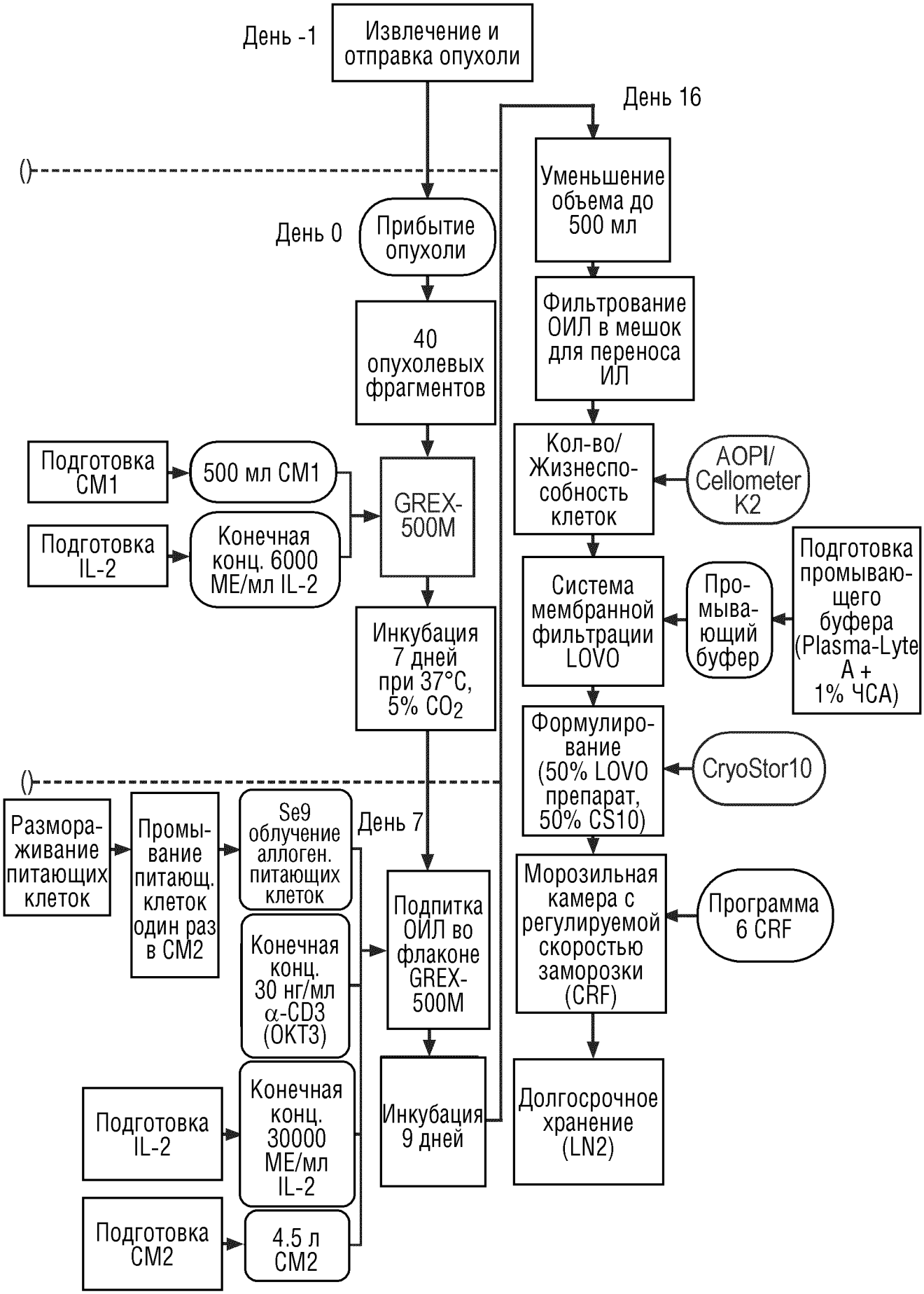
ФИГ.5

План-график ОИЛ-терапии - v2A - день 16 ПБР >250e6



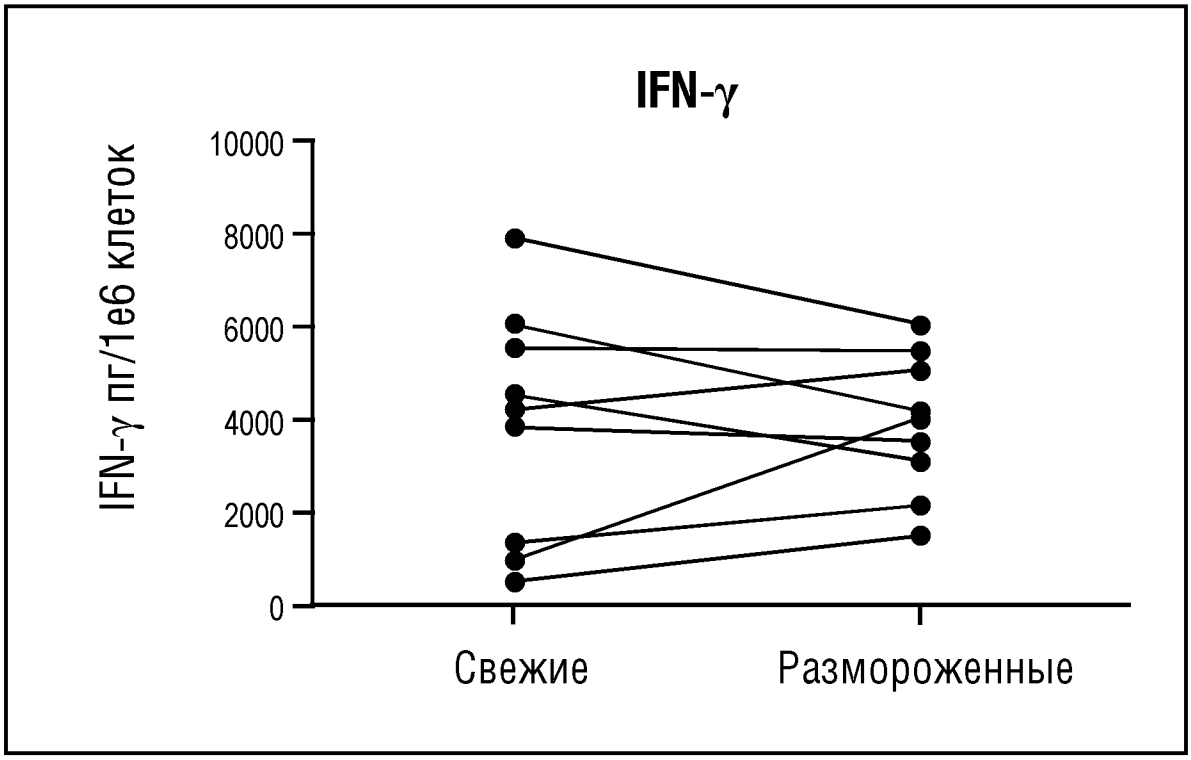
5/151

ФИГ.6


День -1
Извлечение и отправка опухоли
День 16
Уменьшение объема до 500 мл
День 0
Прибытие опухоли
Фильтрование ОИЛ в мешок для переноса ИЛ
40 опухолевых фрагментов
Подготовка CM1
500 мл CM1
GREX-500M
Кол-во/ Жизнеспо-собность клеток
AOPI/ Cellometer K2
Подготовка IL-2
Конечная конц. 6000 МЕ/мл IL-2
Система мембранной фильтрации LOVO
Про-мыва-ющий буфер
Подготовка промываю-щего буфера (Plasma-Lyte A + 1% ЧСА)
Инкубация 7 дней при 37°C, 5% CO_2
Формулиро-вание (50% LOVO препарат, 50% CS10)
CryoStor10
Размора-живание питающих клеток
Промы-вание питающ. клеток один раз в CM2
Se9 облучение аллоген. питающих клеток
День 7
Морозильная камера с регулируемой скоростью заморозки (CRF)
Программа 6 CRF
Конечная конц. 30 нг/мл α-CD3 (OKT3)
Подпитка ОИЛ во флаконе GREX-500M
Конечная конц. 30000 МЕ/мл IL-2
Подготовка IL-2
Инкубация 9 дней
Долгосрочное хранение (LN2)
Подготовка CM2
4.5 л CM2

ФИГ.7

P-значение	0.9797
P-значение сводное	н/з
Значимое отличие? (P <0.05)	**Нет**
P-значение одно- или двустороннее?	Двустороннее
t, df	t=0.02626 df=8
Число пар	**9**



Насколько эффективным было попарное сравнение?

Коэффициент корреляции (r)

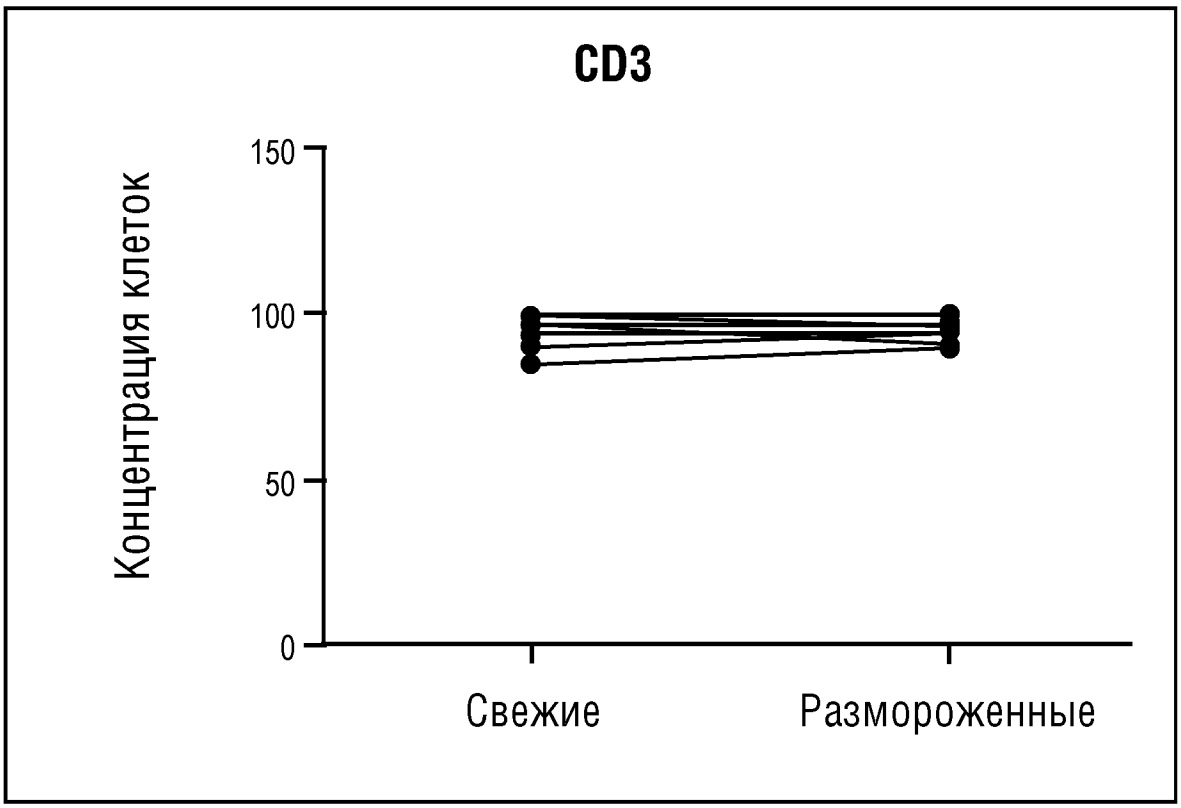
P-значение (одностороннее)

P-значение сводное

Было попарное сравнение значимо эффективным?

ФИГ.8

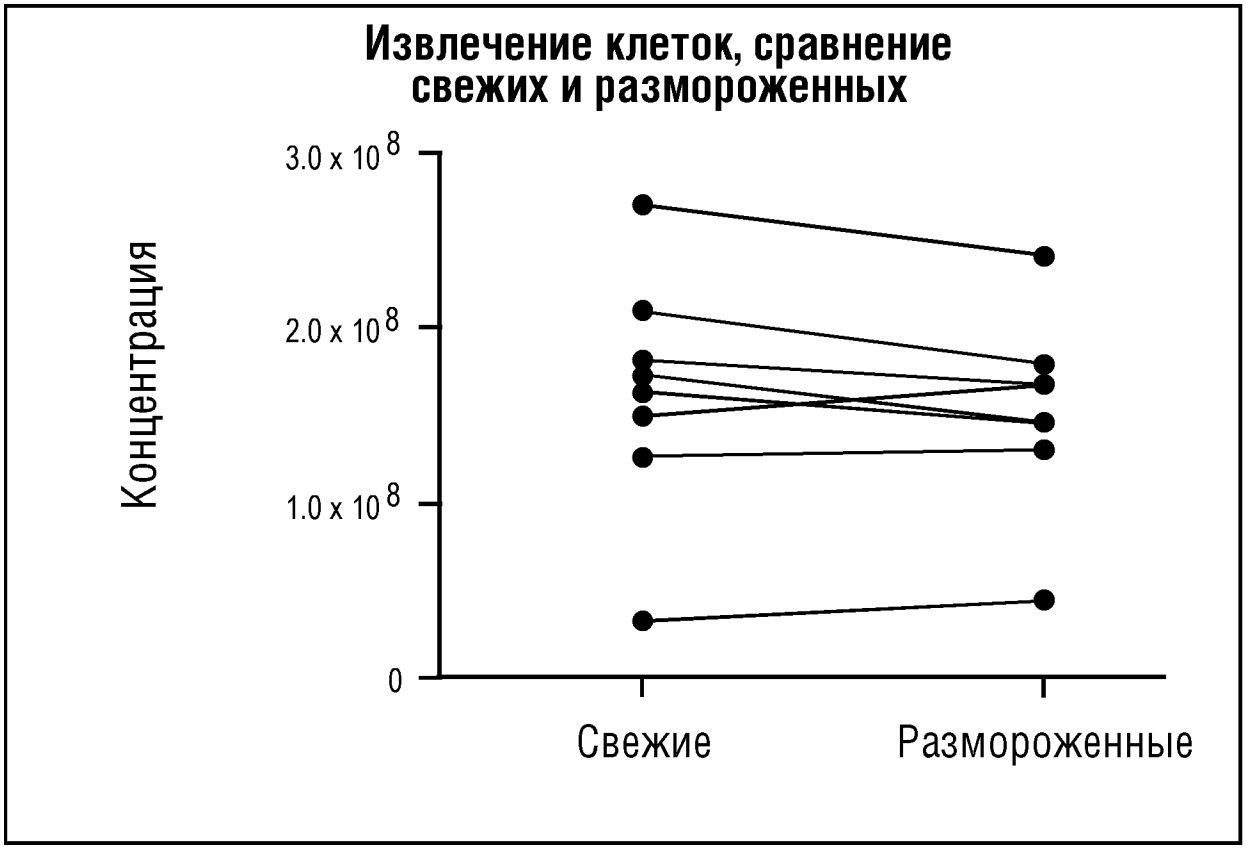
P-значение сводное	н/з
Значимое отличие? (P <0.05)	Нет
P-значение одно- или двустороннее?	Двустороннее
t, df	t=0.8479 df=7
Число пар	8



Насколько эффективным было попарное сравнение?	
Коэффициент корреляции (r)	0.9711
P-значение (одностороннее)	< 0.0001
P-значение сводное	****
Было попарное сравнение значимо эффективным?	Да

ФИГ.9

P-значение сводное	н/з
Значимое отличие? (P <0.05)	Нет
P-значение одно- или двустороннее?	Двустороннее
t, df	t=1.568 df=7
Число пар	8

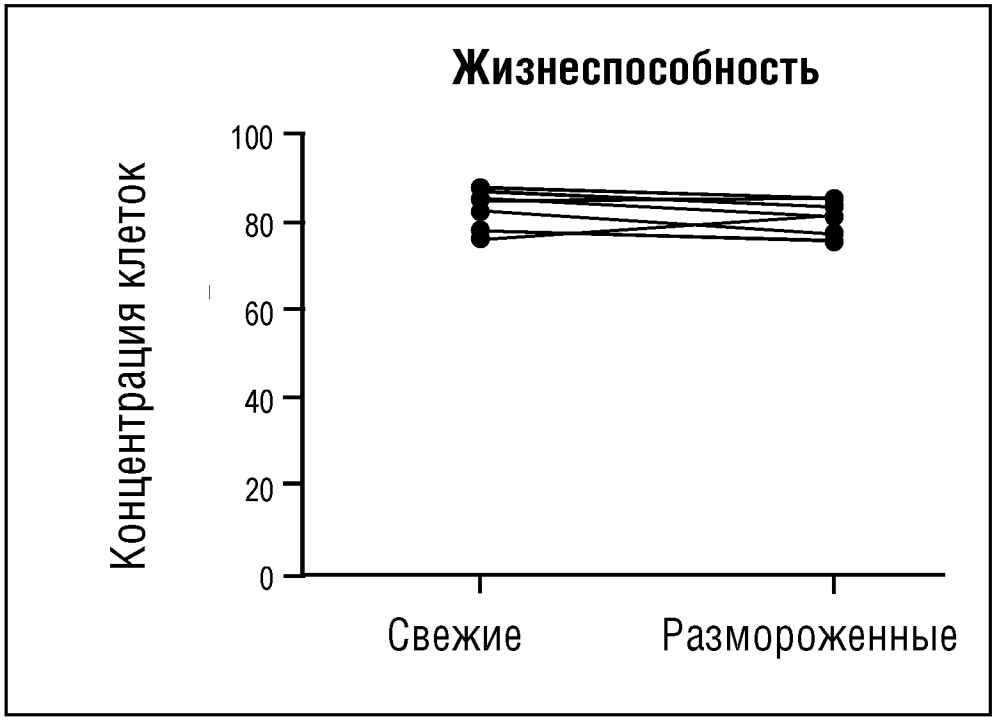


Насколько эффективным было попарное сравнение?

Коэффициент корреляции (r)	0.7448
P-значение (одностороннее)	0.017
P-значение сводное	*
Было попарное сравнение значимо эффективным?	Да

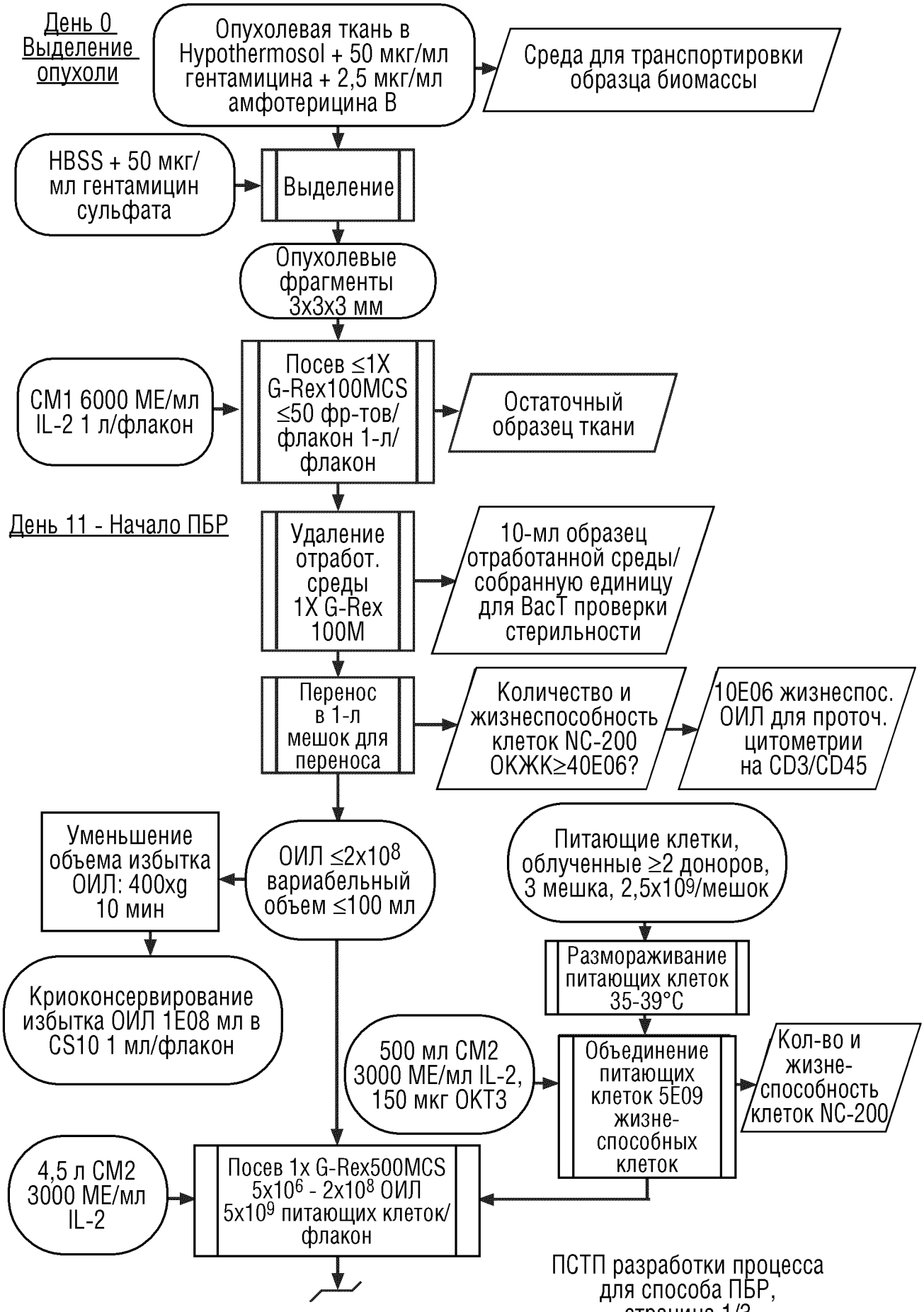
ФИГ.10

P-значение сводное	н/з
Значимое отличие? (P <0.05)	Нет
P-значение одно- или двустороннее?	Двустороннее
t, df	t=1.596 df=7
Число пар	8



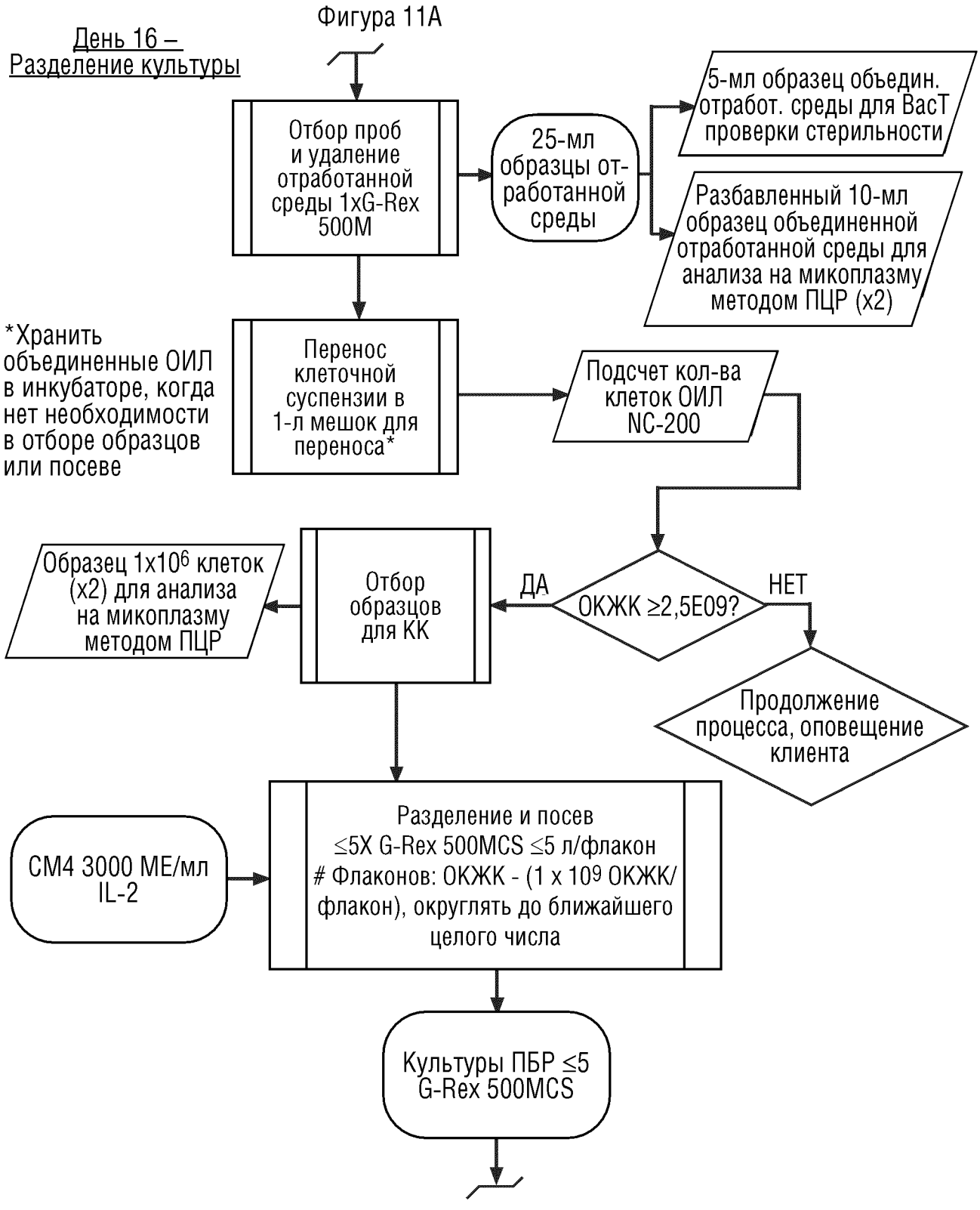
Насколько эффективным было попарное сравнение?	
Коэффициент корреляции (r)	0.6932
P-значение (одностороннее)	0.0283
P-значение сводное	*
Было попарное сравнение значимо эффективным?	Да

ФИГ.11А



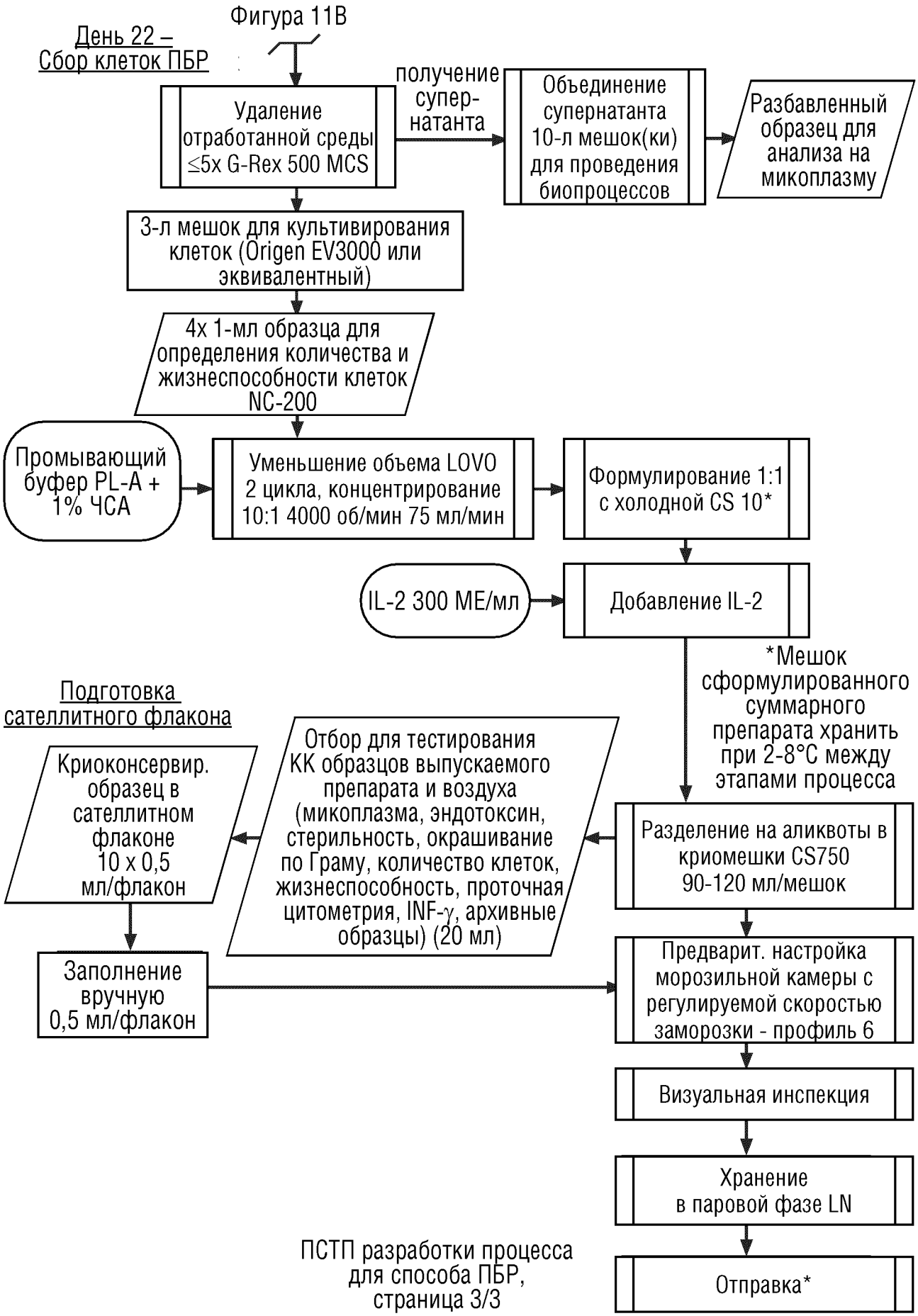
Фигура 11В

ФИГ.11В

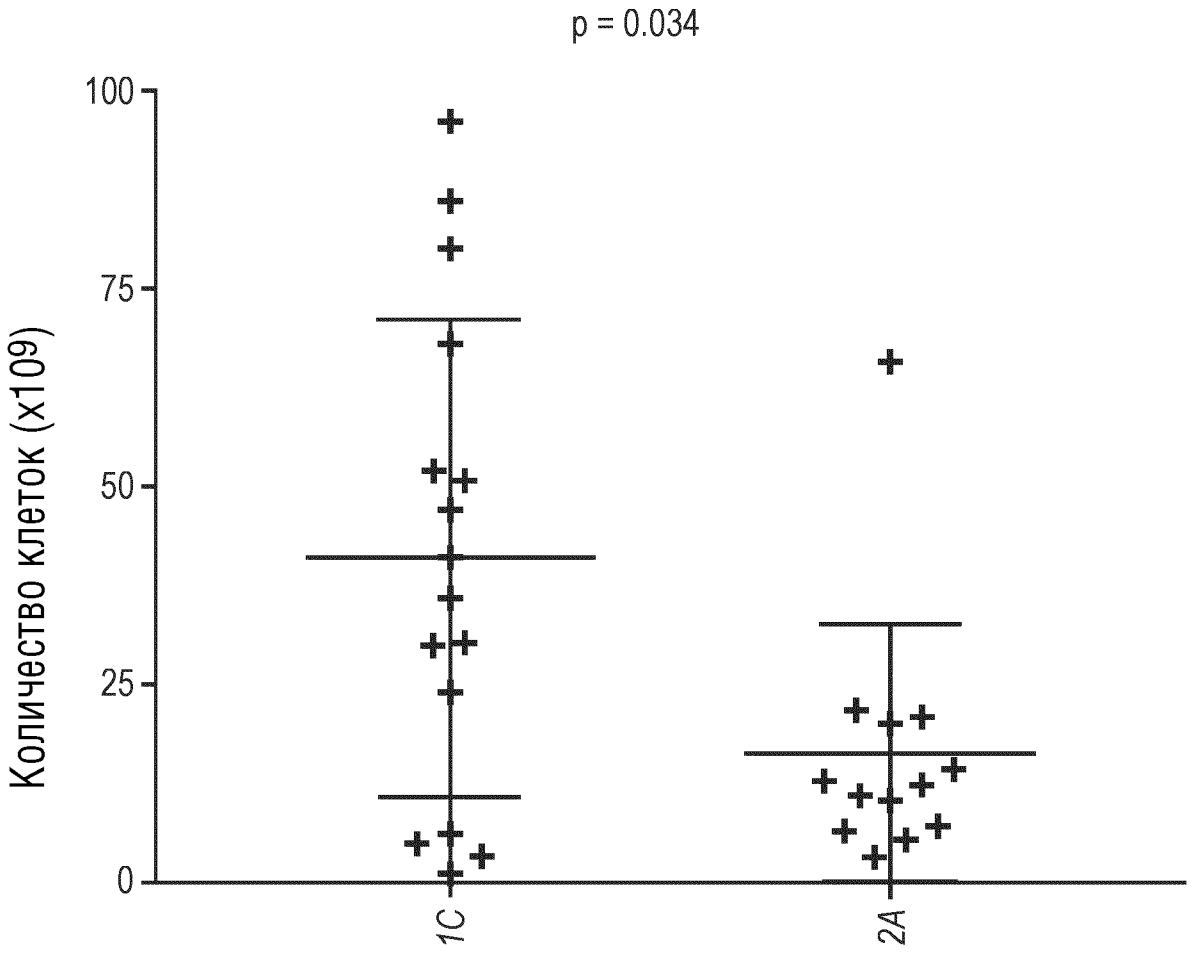


ПСТП разработки процесса для способа ПБР, страница 2/3

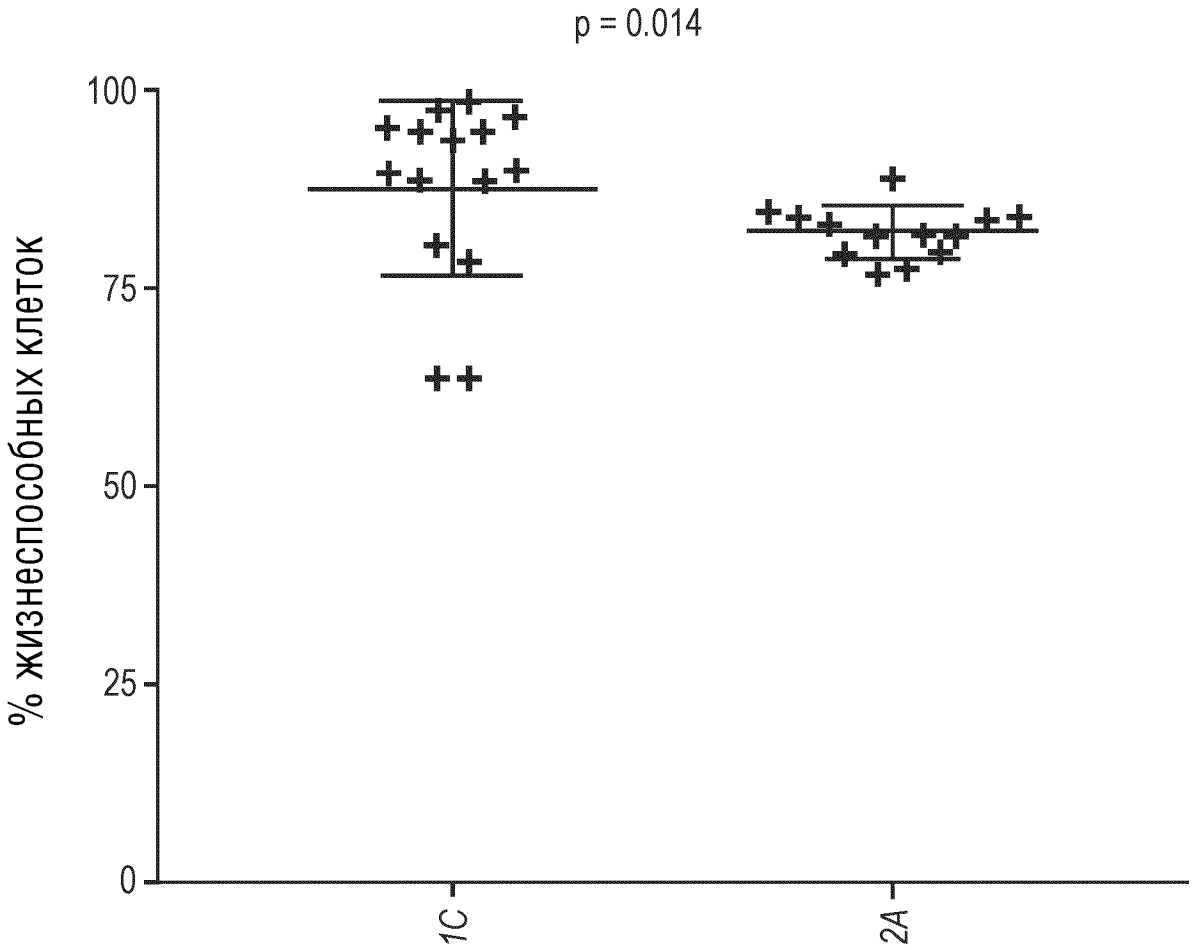
ФИГ.11C


Фигура 11B
День 22 –
Сбор клеток ПБР
Удаление отработанной среды ≤5x G-Rex 500 MCS
получение супер-натанта
Объединение супернатанта 10-л мешок(ки) для проведения биопроцессов
Разбавленный образец для анализа на микоплазму
3-л мешок для культивирования клеток (Origen EV3000 или эквивалентный)
4x 1-мл образца для определения количества и жизнеспособности клеток NC-200
Промывающий буфер PL-A + 1% ЧСА
Уменьшение объема LOVO 2 цикла, концентрирование 10:1 4000 об/мин 75 мл/мин
Формулирование 1:1 с холодной CS 10*
IL-2 300 МЕ/мл
Добавление IL-2
*Мешок сформулированного суммарного препарата хранить при 2-8°C между этапами процесса
Подготовка сателлитного флакона
Криоконсервир. образец в сателлитном флаконе 10 x 0,5 мл/флакон
Отбор для тестирования КК образцов выпускаемого препарата и воздуха (микоплазма, эндотоксин, стерильность, окрашивание по Граму, количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия, INF-γ, архивные образцы) (20 мл)
Разделение на аликвоты в криомешки CS750 90-120 мл/мешок
Заполнение вручную 0,5 мл/флакон
Предварит. настройка морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки - профиль 6
Визуальная инспекция
Хранение в паровой фазе LN
Отправка*
ПСТП разработки процесса для способа ПБР, страница 3/3

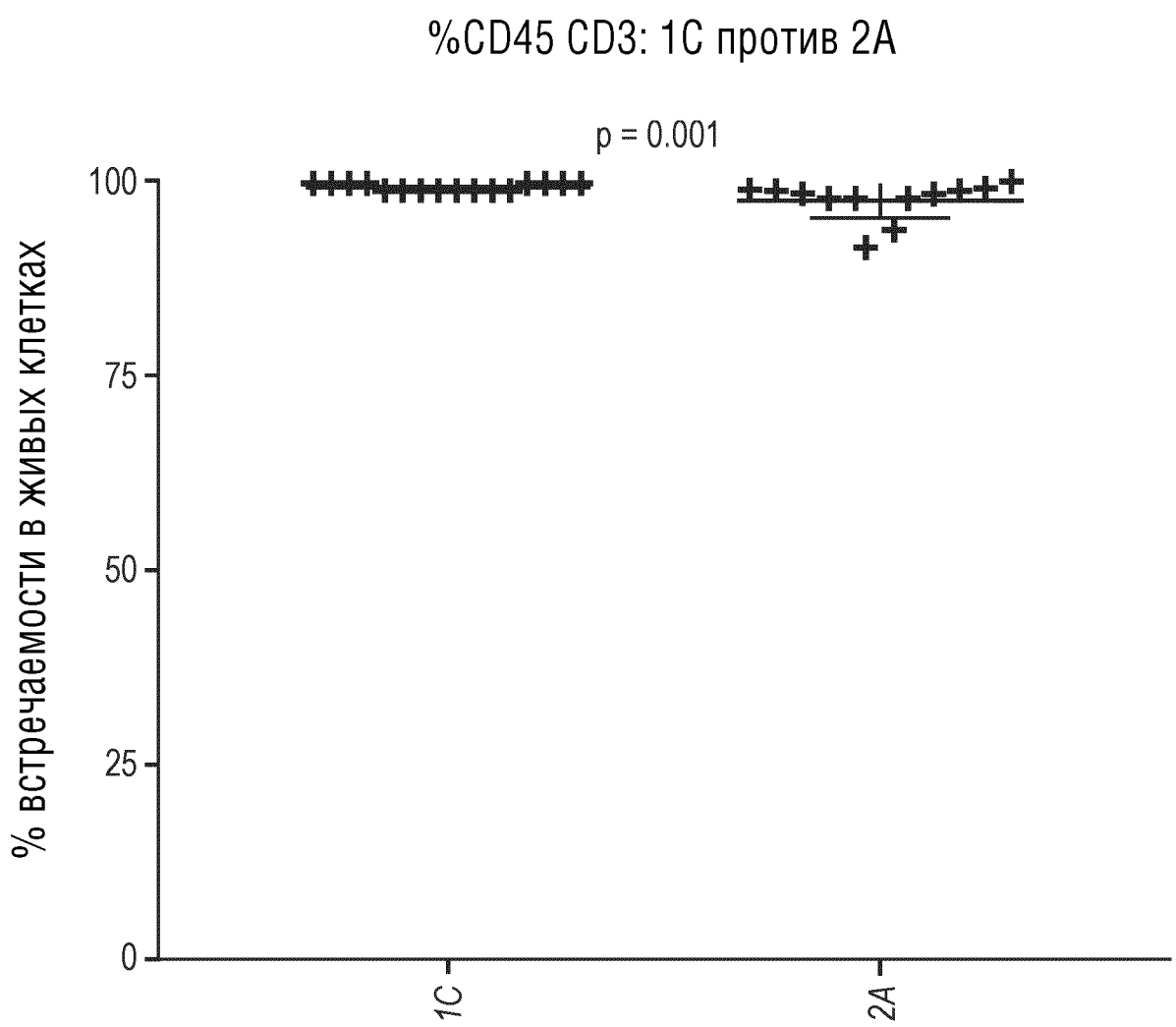
ФИГ.12



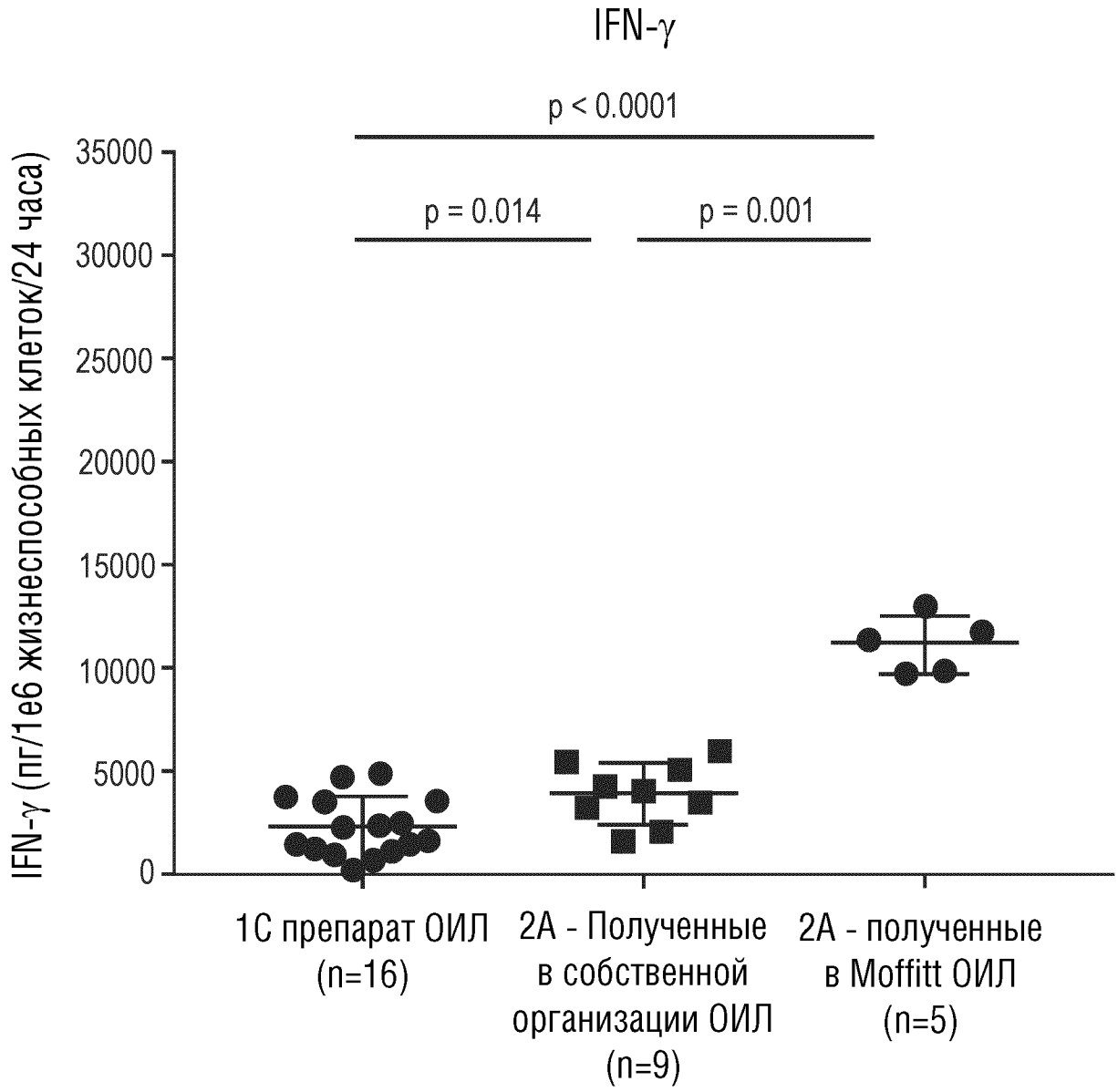
ФИГ.13



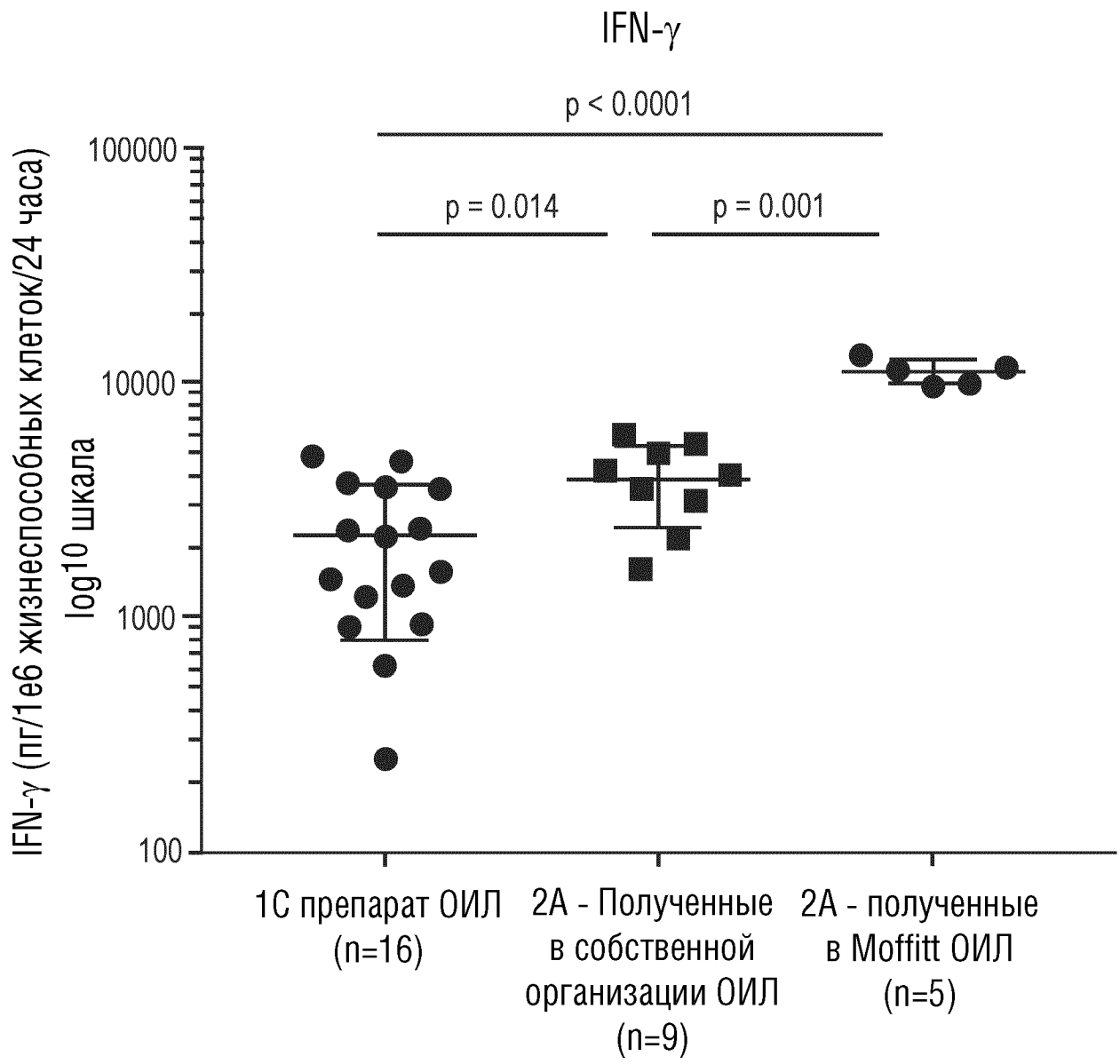
ФИГ.14


%CD45 CD3: 1C против 2A
p = 0.001
% встречаемости в живых клетках
100
75
50
25
0
1C
2A

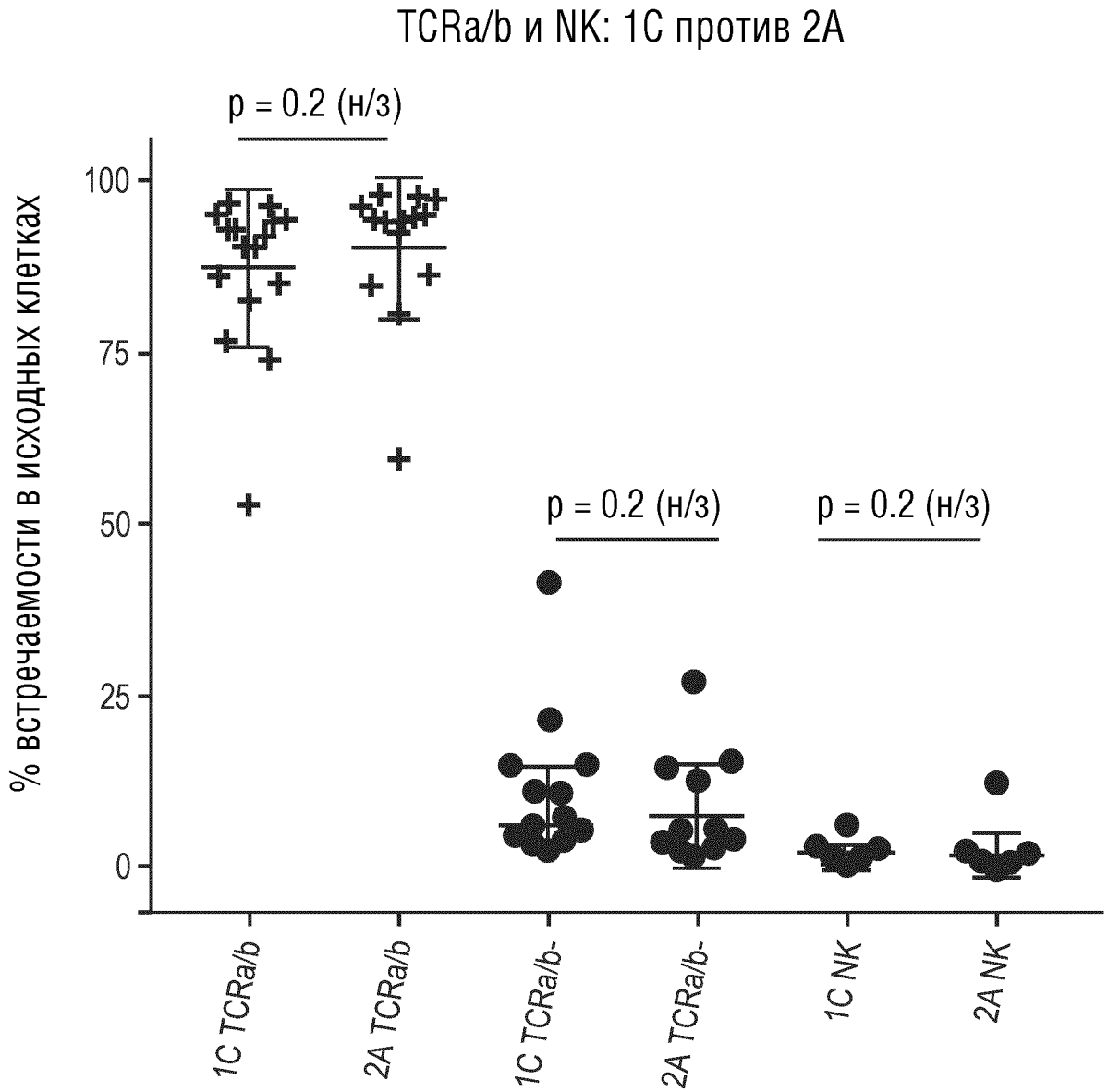
ФИГ.15


IFN-γ
p < 0.0001
p = 0.014
p = 0.001
IFN-γ (пг/1e6 жизнеспособных клеток/24 часа)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1C препарат ОИЛ (n=16)
2A - Полученные в собственной организации ОИЛ (n=9)
2A - полученные в Moffitt ОИЛ (n=5)

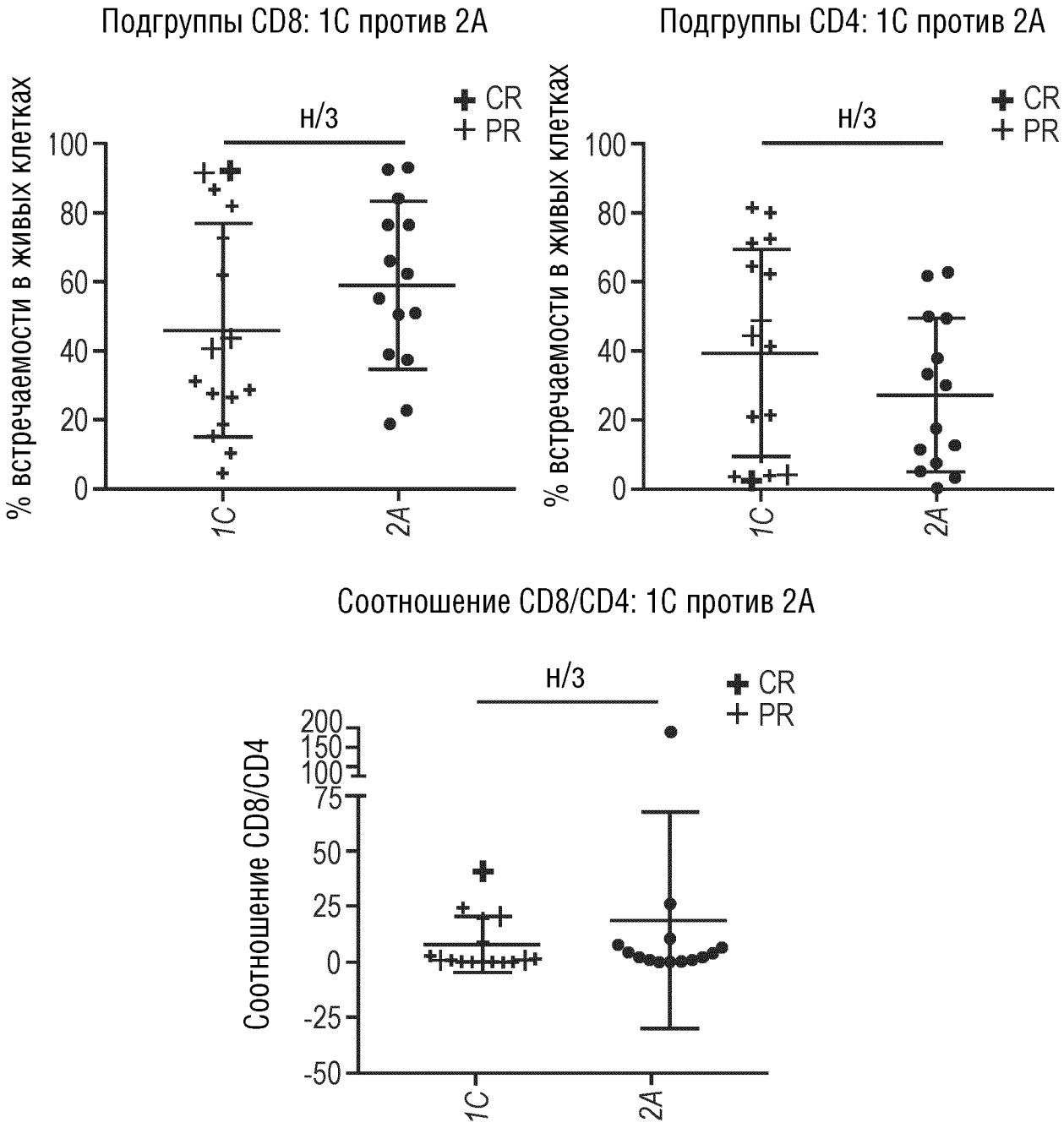
ФИГ.16


IFN-γ
p < 0.0001
p = 0.014
p = 0.001
IFN-γ (пг/1e6 жизнеспособных клеток/24 часа)
log10 шкала
100000
10000
1000
100
1С препарат ОИЛ (n=16)
2А - Полученные в собственной организации ОИЛ (n=9)
2А - полученные в Moffitt ОИЛ (n=5)

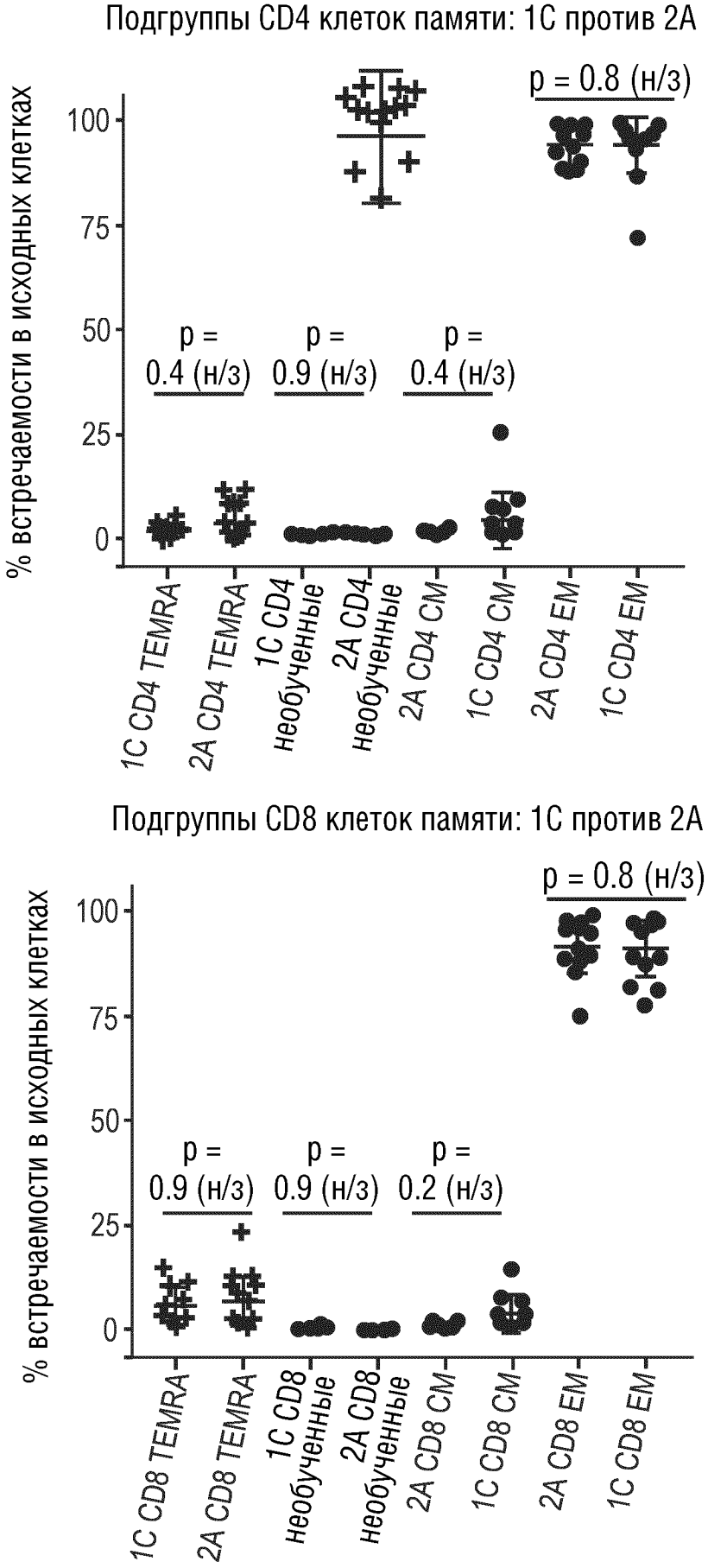
ФИГ.17


TCRa/b и NK: 1C против 2A
p = 0.2 (н/з)
p = 0.2 (н/з)
p = 0.2 (н/з)
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
1C TCRa/b
2A TCRa/b
1C TCRa/b-
2A TCRa/b-
1C NK
2A NK

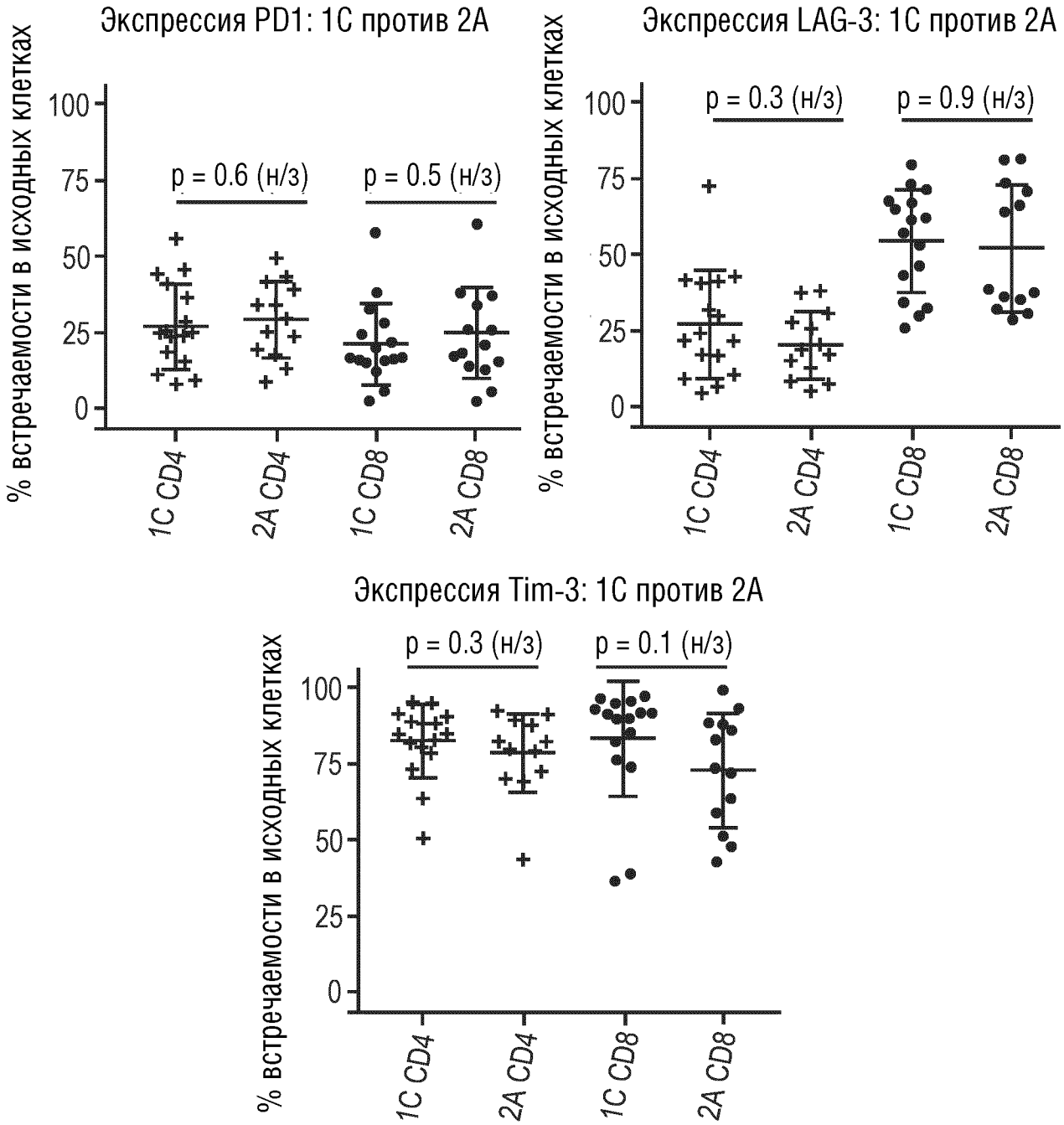
ФИГ.18


Подгруппы CD8: 1C против 2A
% встречаемости в живых клетках
CR
PR
н/з
100
80
60
40
20
0
1C
2A
Подгруппы CD4: 1C против 2A
% встречаемости в живых клетках
CR
PR
н/з
100
80
60
40
20
0
1C
2A
Соотношение CD8/CD4: 1C против 2A
Соотношение CD8/CD4
CR
PR
н/з
200
150
100
75
50
25
0
-25
-50
1C
2A

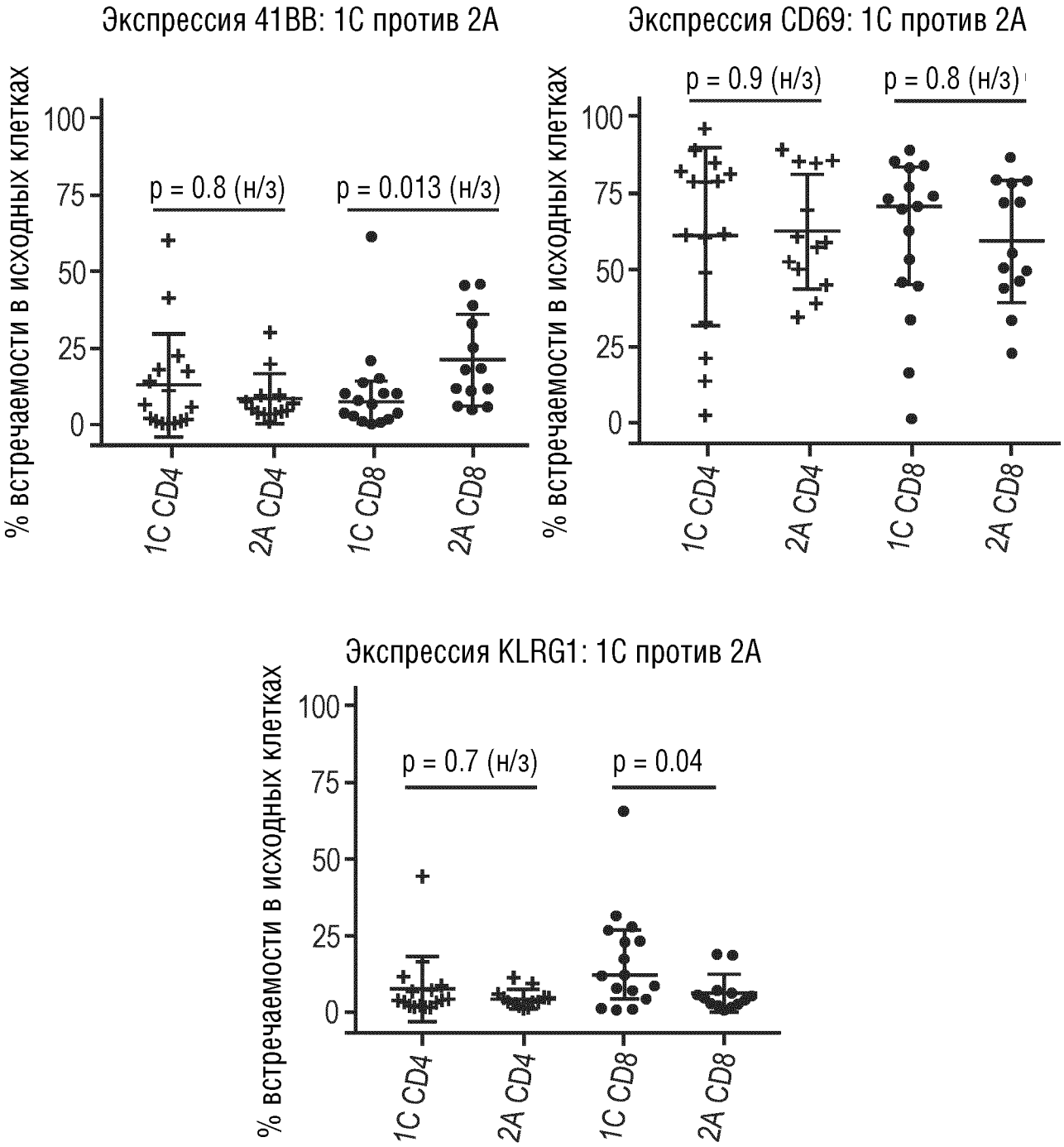
ФИГ.19


Подгруппы CD4 клеток памяти: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.8 (н/з)
p = 0.4 (н/з)
p = 0.9 (н/з)
p = 0.4 (н/з)
1C CD4 TEMRA
2A CD4 TEMRA
1C CD4 необученные
2A CD4 необученные
2A CD4 CM
1C CD4 CM
2A CD4 EM
1C CD4 EM
Подгруппы CD8 клеток памяти: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.8 (н/з)
p = 0.9 (н/з)
p = 0.9 (н/з)
p = 0.2 (н/з)
1C CD8 TEMRA
2A CD8 TEMRA
1C CD8 необученные
2A CD8 необученные
2A CD8 CM
1C CD8 CM
2A CD8 EM
1C CD8 EM

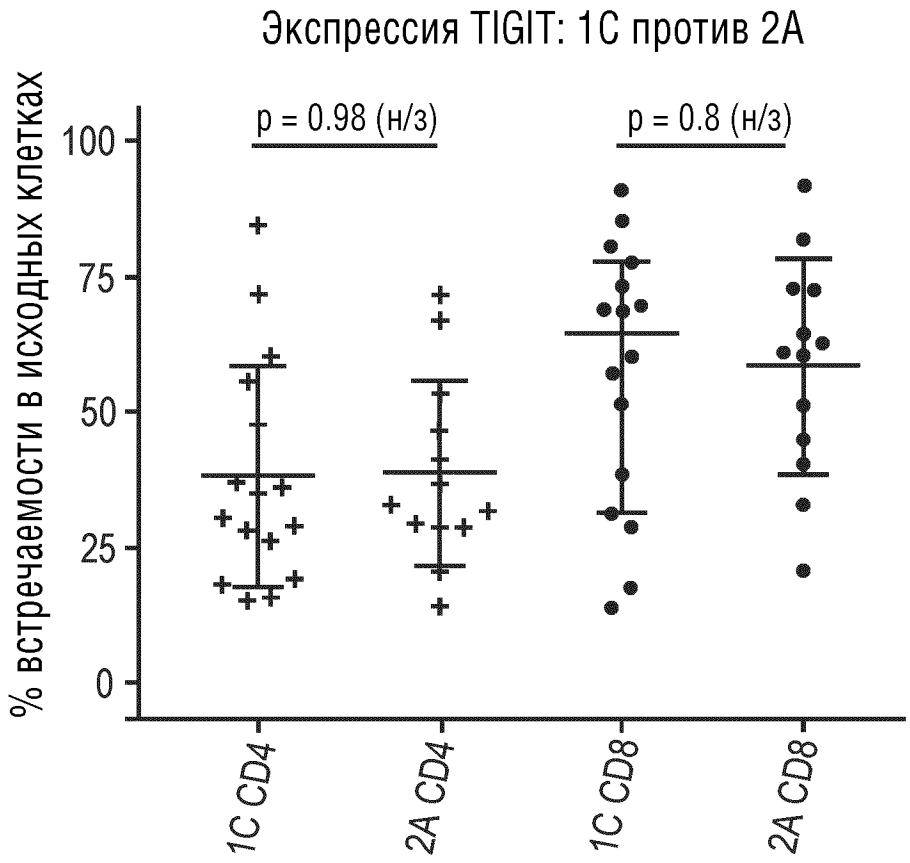
ФИГ.20


Экспрессия PD1: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.6 (н/з)
p = 0.5 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Экспрессия LAG-3: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
p = 0.3 (н/з)
p = 0.9 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Экспрессия Tim-3: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
p = 0.3 (н/з)
p = 0.1 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

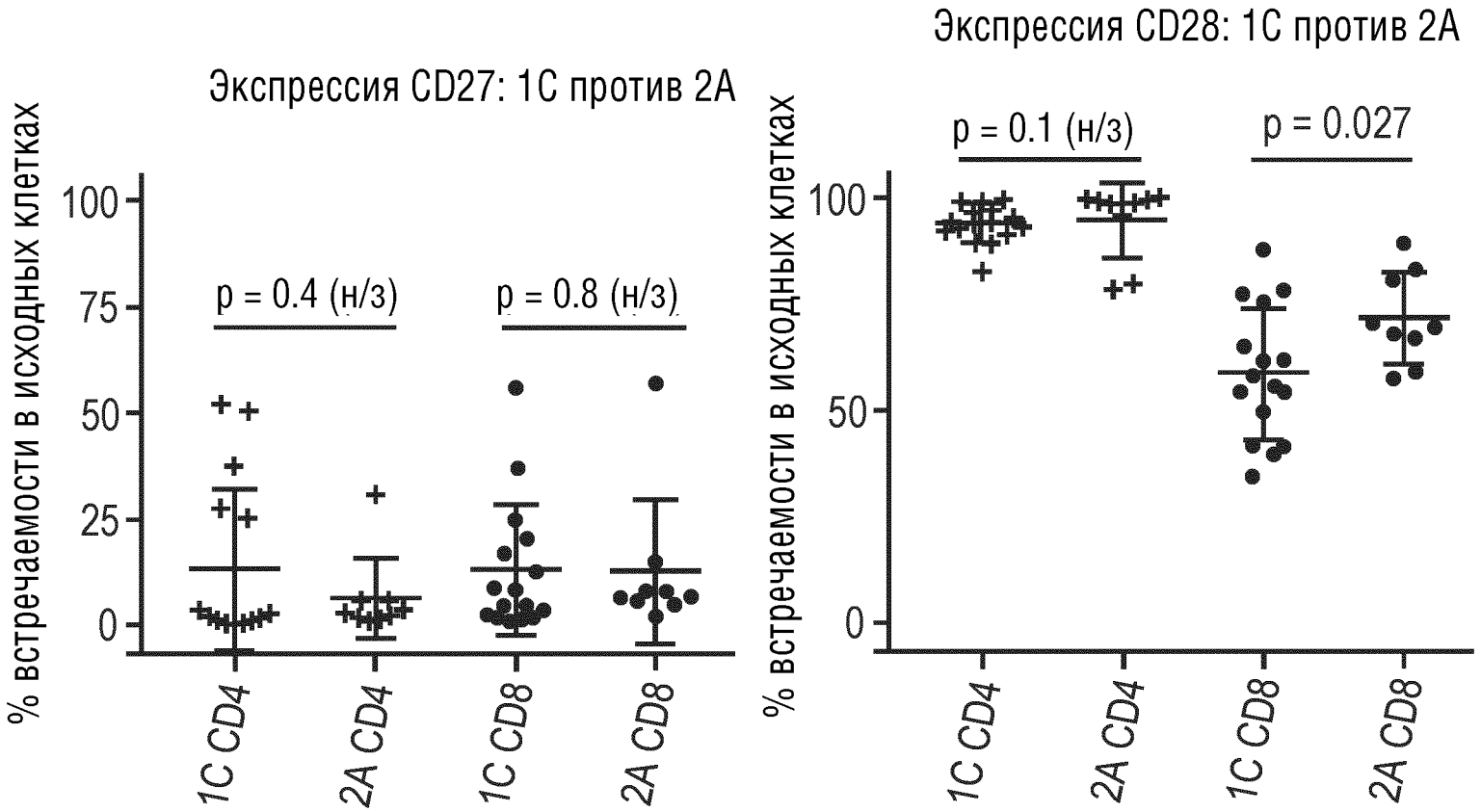
ФИГ.21


Экспрессия 41BB: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.8 (н/з)
p = 0.013 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Экспрессия CD69: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
p = 0.9 (н/з)
p = 0.8 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Экспрессия KLRG1: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
p = 0.7 (н/з)
p = 0.04
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

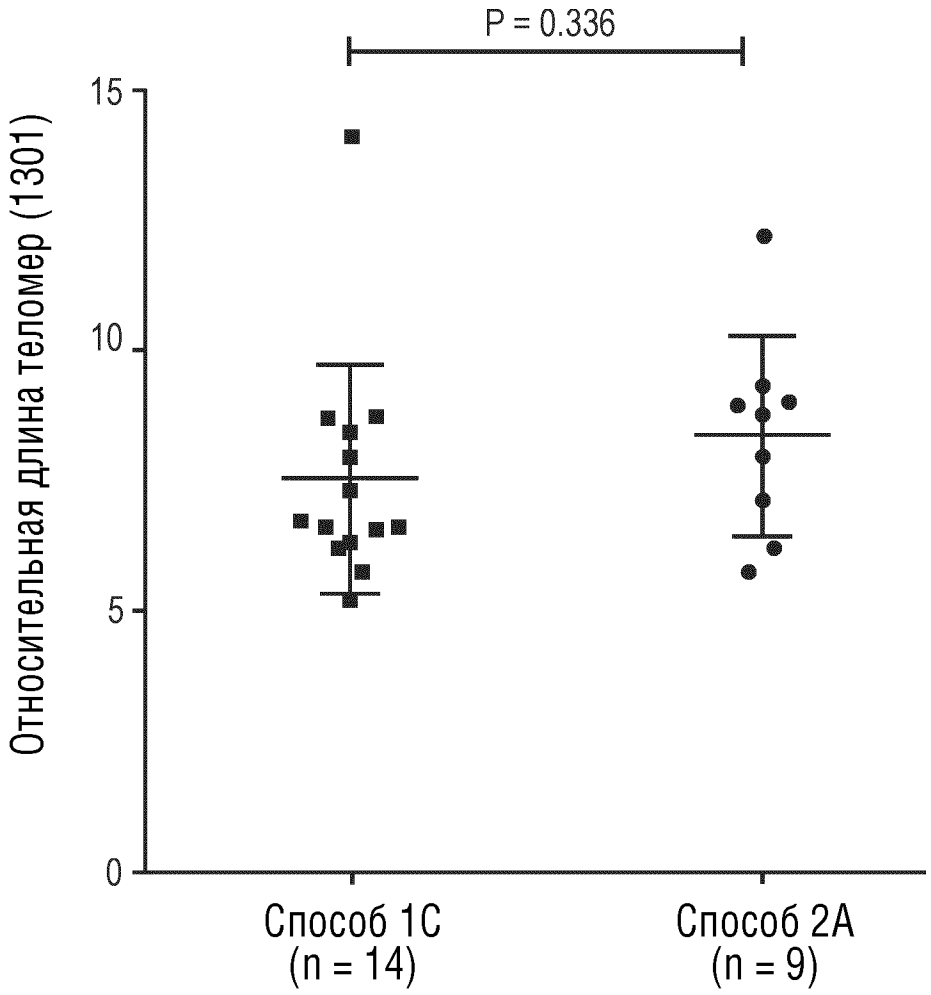
ФИГ.22


Экспрессия TIGIT: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.98 (н/з)
p = 0.8 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

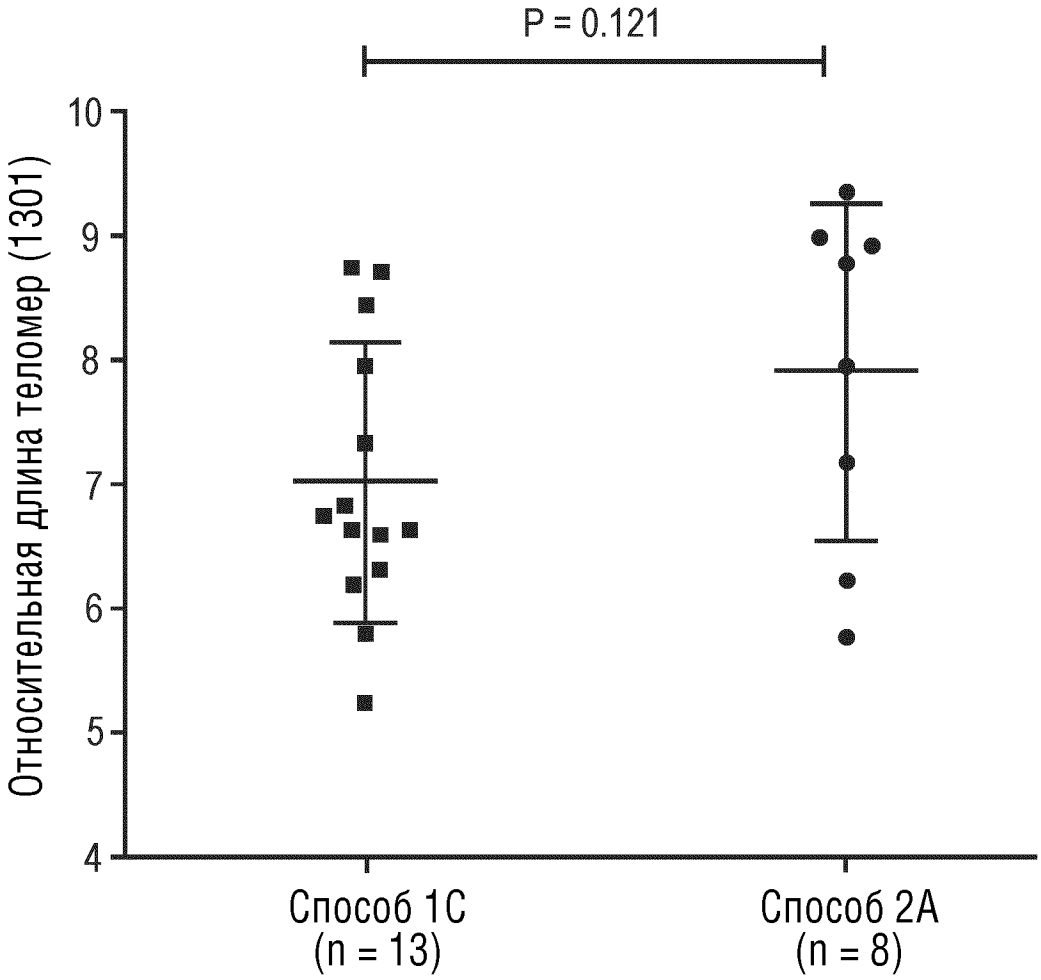
ФИГ.23


Экспрессия CD27: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
75
50
25
0
p = 0.4 (н/з)
p = 0.8 (н/з)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Экспрессия CD28: 1C против 2A
% встречаемости в исходных клетках
100
50
0
p = 0.1 (н/з)
p = 0.027
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

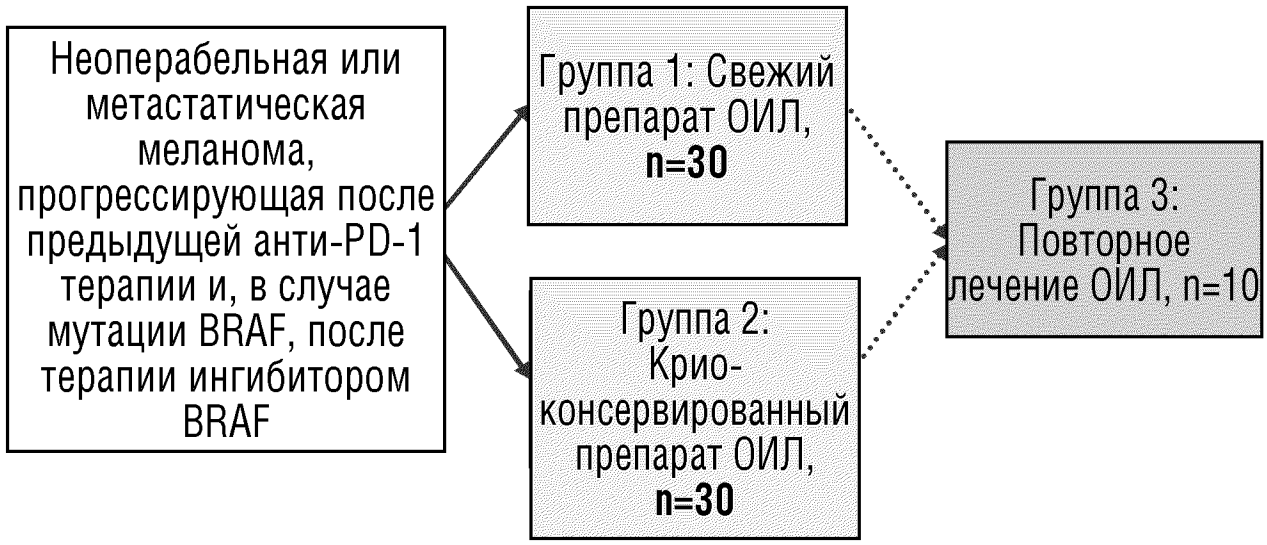
ФИГ.24


P = 0.336
15
10
5
0
Относительная длина теломер (1301)
Способ 1C
(n = 14)
Способ 2A
(n = 9)

ФИГ.25


P = 0.121
Относительная длина теломер (1301)
10
9
8
7
6
5
4
Способ 1C
(n = 13)
Способ 2A
(n = 8)

ФИГ.26


Неоперабельная или метастатическая меланома, прогрессирующая после предыдущей анти-PD-1 терапии и, в случае мутации BRAF, после терапии ингибитором BRAF
Группа 1: Свежий препарат ОИЛ, n=30
Группа 2: Крио-консервированный препарат ОИЛ, n=30
Группа 3: Повторное лечение ОИЛ, n=10

ФИГ.27

1. ЭТАП A

Получением образца опухоли пациента

2. ЭТАП B

Фрагментирование и первое размножение – от 3 дней до 14 дней

3. ЭТАП C

Переход от первого размножения ко второму размножению. Отсутствие хранения и закрытая система

4. ЭТАП D

Второе размножение. IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющие питающие клетки. Закрытая система

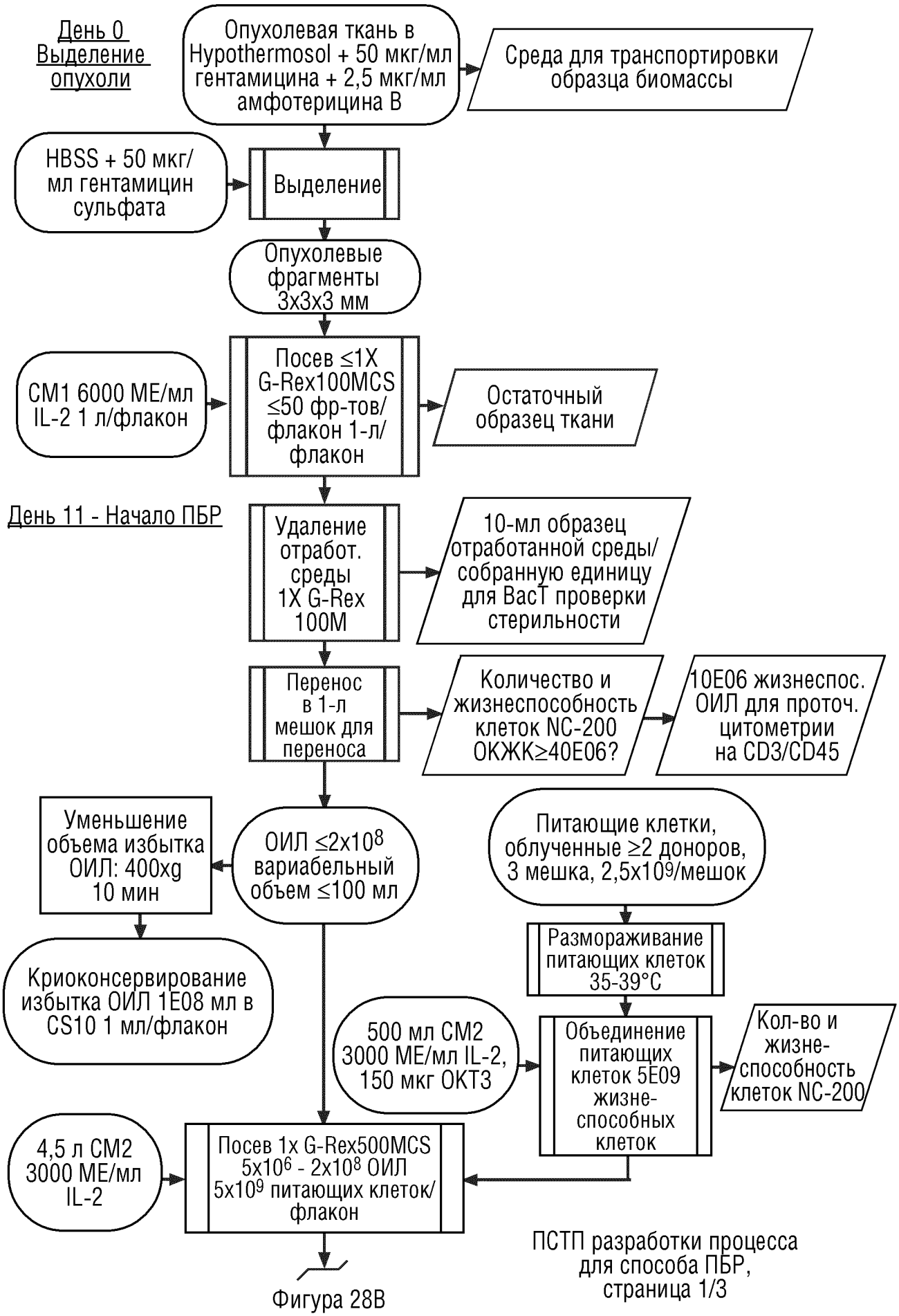
5. ЭТАП E

Сбор ОИЛ из этапа D.
Закрытая система

6. ЭТАП F

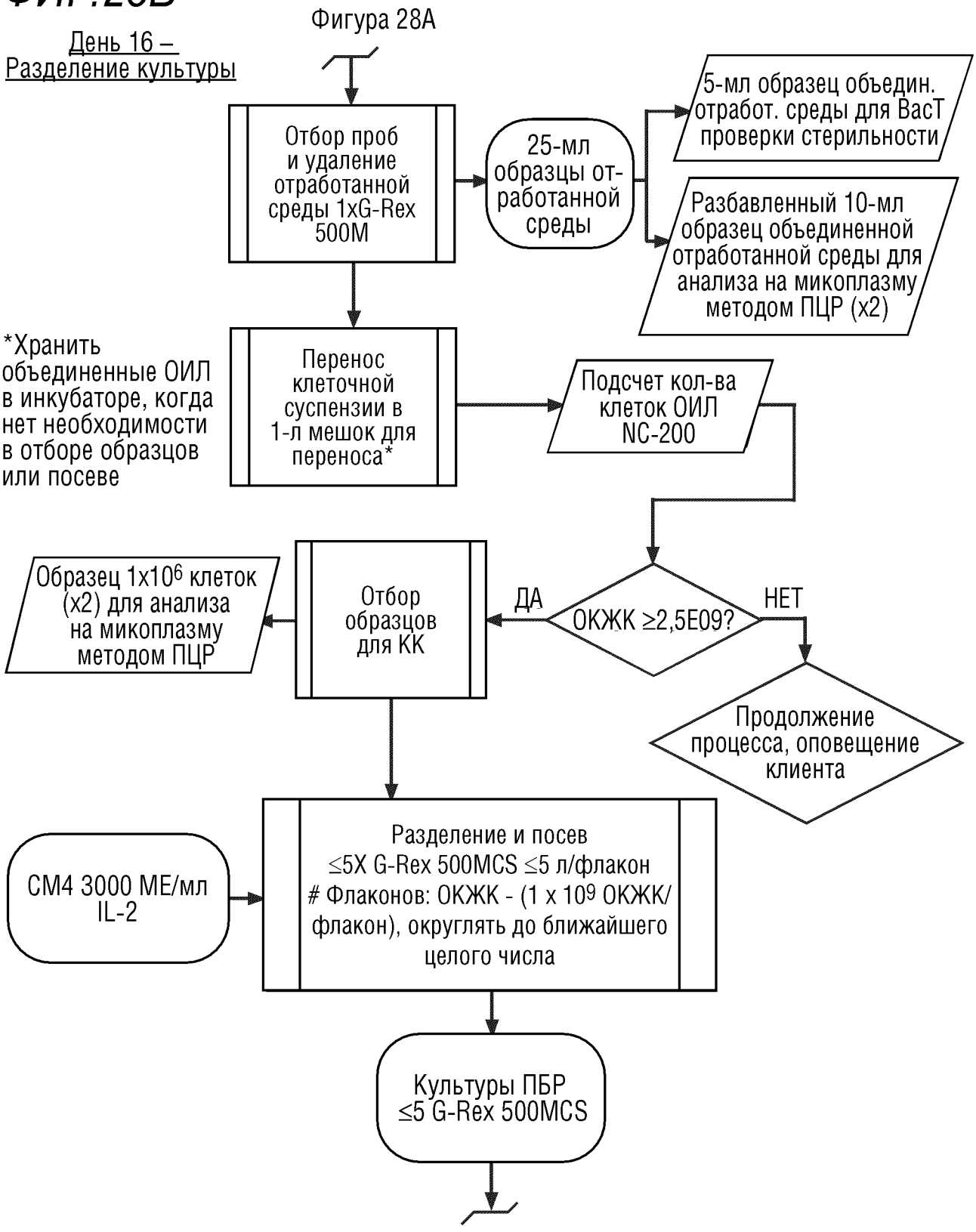
Окончательное формулирование и/или перенос в инфузионный мешок (необязательно, криоконсервирование)

ФИГ.28А



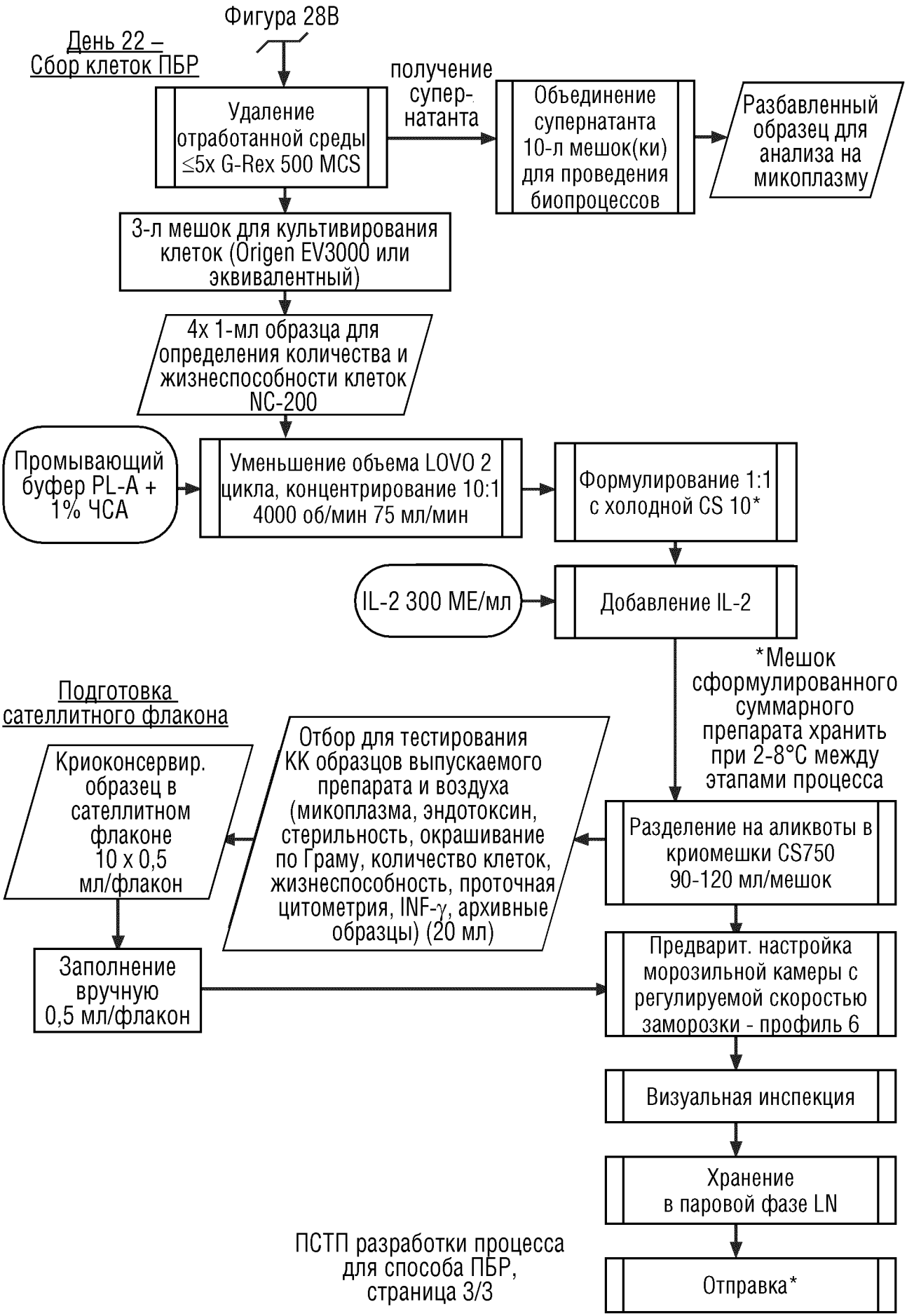
Фигура 28В

ФИГ.28В

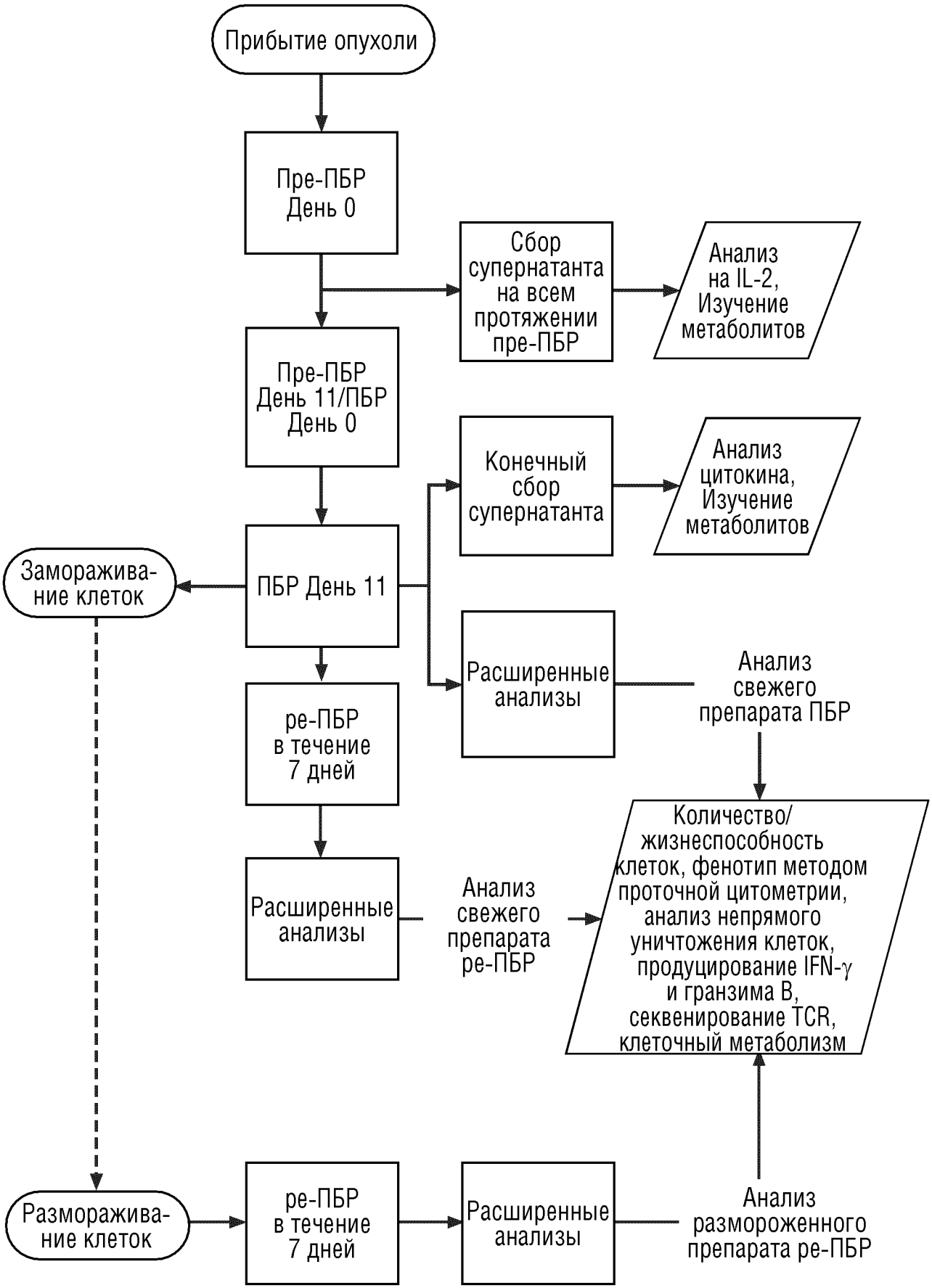


ПСТП разработки процесса для способа ПБР, страница 2/3

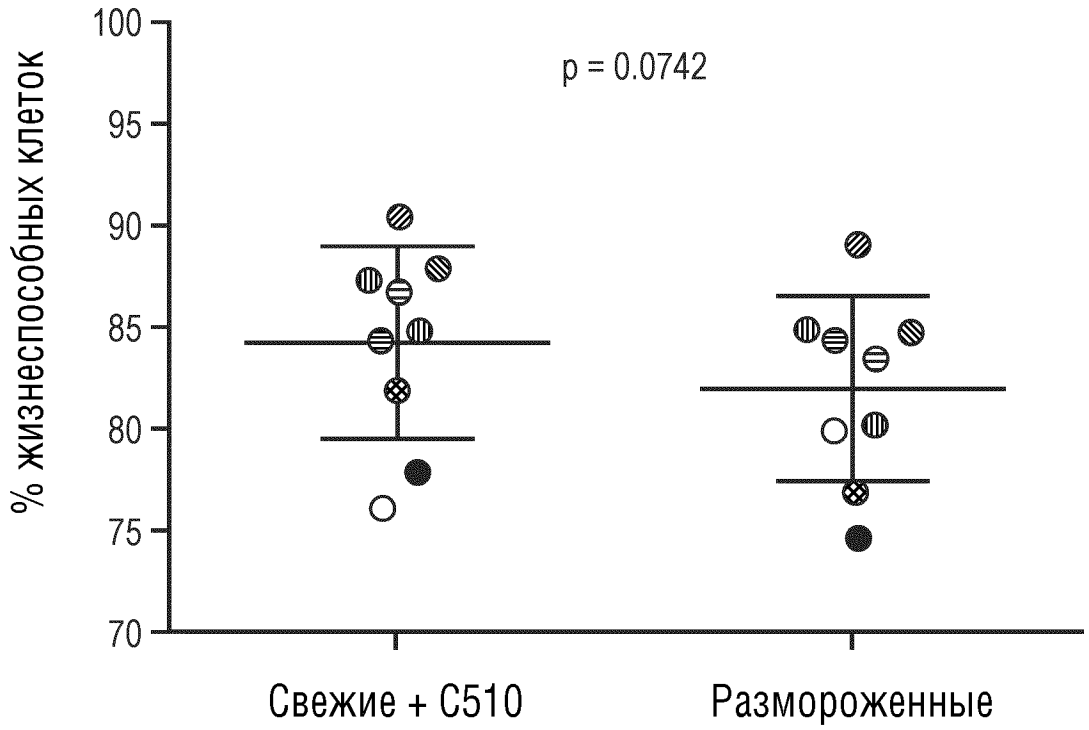
ФИГ.28С


Фигура 28В
День 22 –
Сбор клеток ПБР
Удаление отработанной среды ≤5x G-Rex 500 MCS
получение супер-натанта
Объединение супернатанта 10-л мешок(ки) для проведения биопроцессов
Разбавленный образец для анализа на микоплазму
3-л мешок для культивирования клеток (Origen EV3000 или эквивалентный)
4x 1-мл образца для определения количества и жизнеспособности клеток NC-200
Промывающий буфер PL-A + 1% ЧСА
Уменьшение объема LOVO 2 цикла, концентрирование 10:1 4000 об/мин 75 мл/мин
Формулирование 1:1 с холодной CS 10*
IL-2 300 МЕ/мл
Добавление IL-2
*Мешок сформулированного суммарного препарата хранить при 2-8°C между этапами процесса
Подготовка сателлитного флакона
Криоконсервир. образец в сателлитном флаконе 10 x 0,5 мл/флакон
Отбор для тестирования КК образцов выпускаемого препарата и воздуха (микоплазма, эндотоксин, стерильность, окрашивание по Граму, количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия, INF-γ, архивные образцы) (20 мл)
Разделение на аликвоты в криомешки CS750 90-120 мл/мешок
Заполнение вручную 0,5 мл/флакон
Предварит. настройка морозильной камеры с регулируемой скоростью заморозки - профиль 6
Визуальная инспекция
Хранение в паровой фазе LN
Отправка*
ПСТП разработки процесса для способа ПБР, страница 3/3

ФИГ.29


Прибытие опухоли
Пре-ПБР
День 0
Сбор
супернатанта
на всем
протяжении
пре-ПБР
Анализ
на IL-2,
Изучение
метаболитов
Пре-ПБР
День 11/ПБР
День 0
Конечный
сбор
супернатанта
Анализ
цитокина,
Изучение
метаболитов
Замораживание клеток
ПБР День 11
Расширенные
анализы
Анализ
свежего
препарата ПБР
ре-ПБР
в течение
7 дней
Количество/
жизнеспособность
клеток, фенотип методом
проточной цитометрии,
анализ непрямого
уничтожения клеток,
продуцирование IFN-γ
и гранзима B,
секвенирование TCR,
клеточный метаболизм
Расширенные
анализы
Анализ
свежего
препарата
ре-ПБР
Размораживание клеток
ре-ПБР
в течение
7 дней
Расширенные
анализы
Анализ
размороженного
препарата ре-ПБР

ФИГ.30


% жизнеспособных клеток
100
95
90
85
80
75
70
p = 0.0742
Свежие + C510
Размороженные

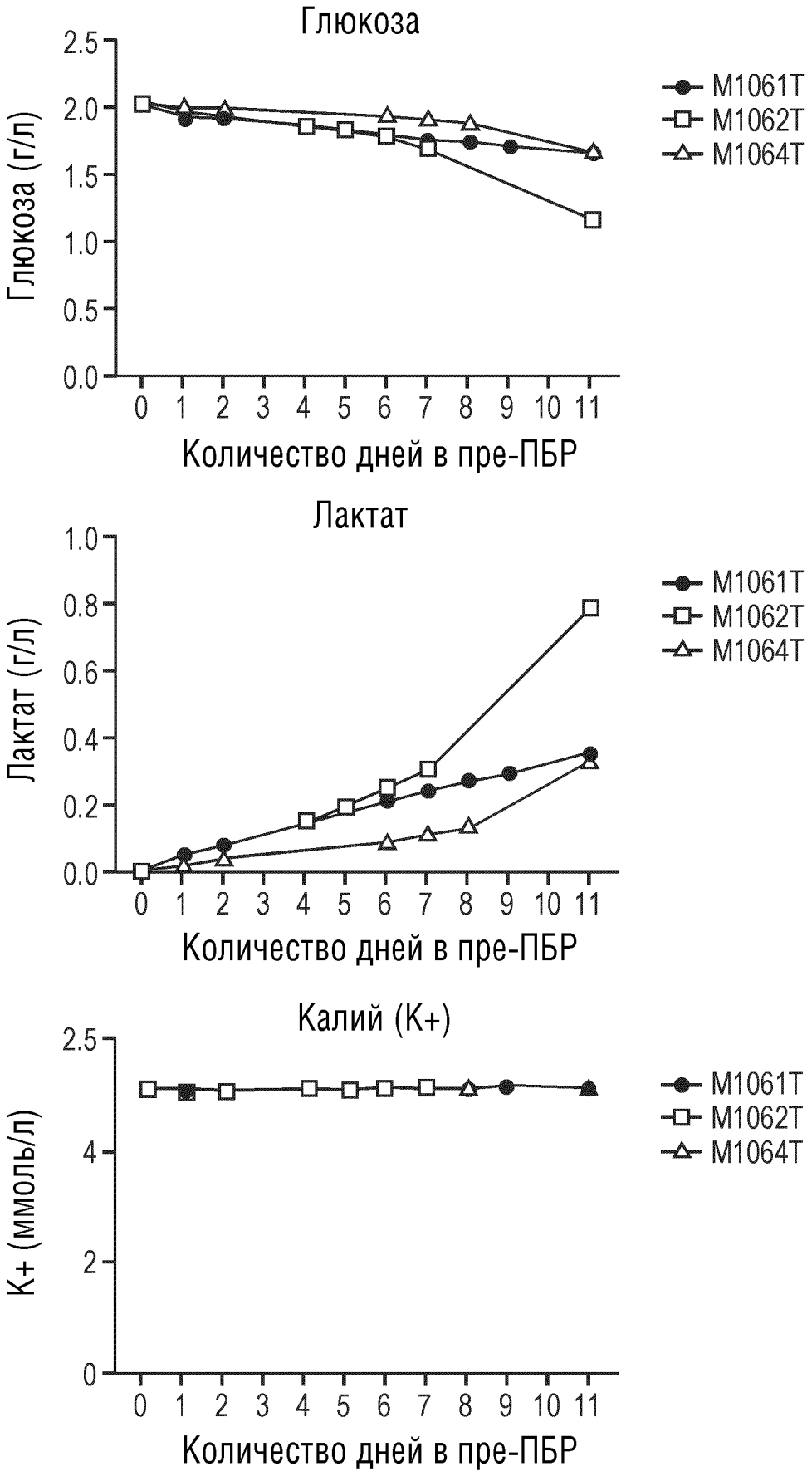
ФИГ.31

ре-ПБР – Кратность увеличения количества клеток
Свежие
Размороженные
Кратность увеличения количества ОИЛ (День 7)
400
300
200
100
0
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023

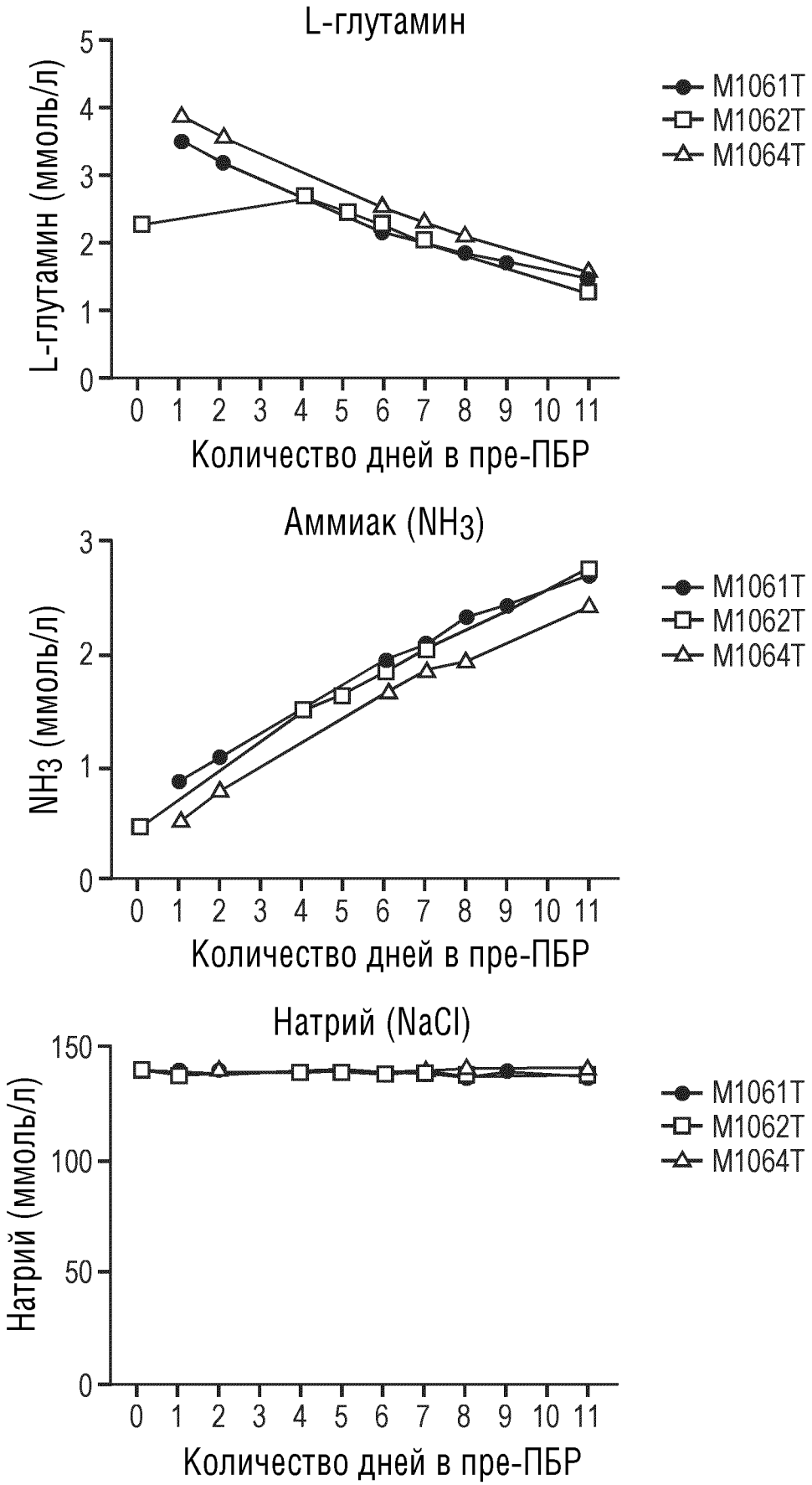
ФИГ.32

Нормальные значения в крови	
Глюкоза	0,7-1 г/л
Глутамин	0,3-0,65 ммоль/л
Натрий	135-145 моль/л
Калий	3,5-5,0 ммоль/л
Молочная кислота	0,060-0,16 г/л
Аммиак	0,023-0,047 ммоль/л

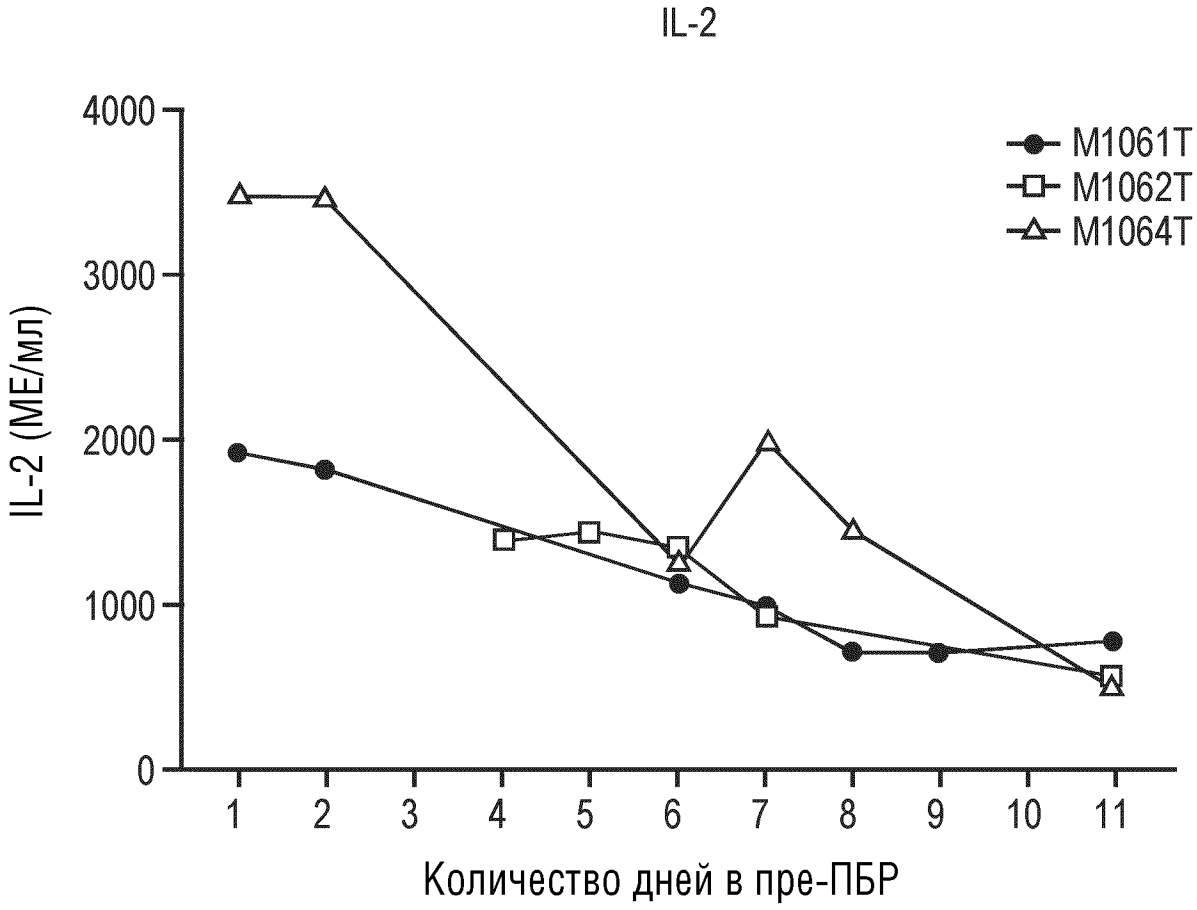
ФИГ.33А


Глюкоза
Глюкоза (г/л)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T
Лактат
Лактат (г/л)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T
Калий (K+)
K+ (ммоль/л)
2.5
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T

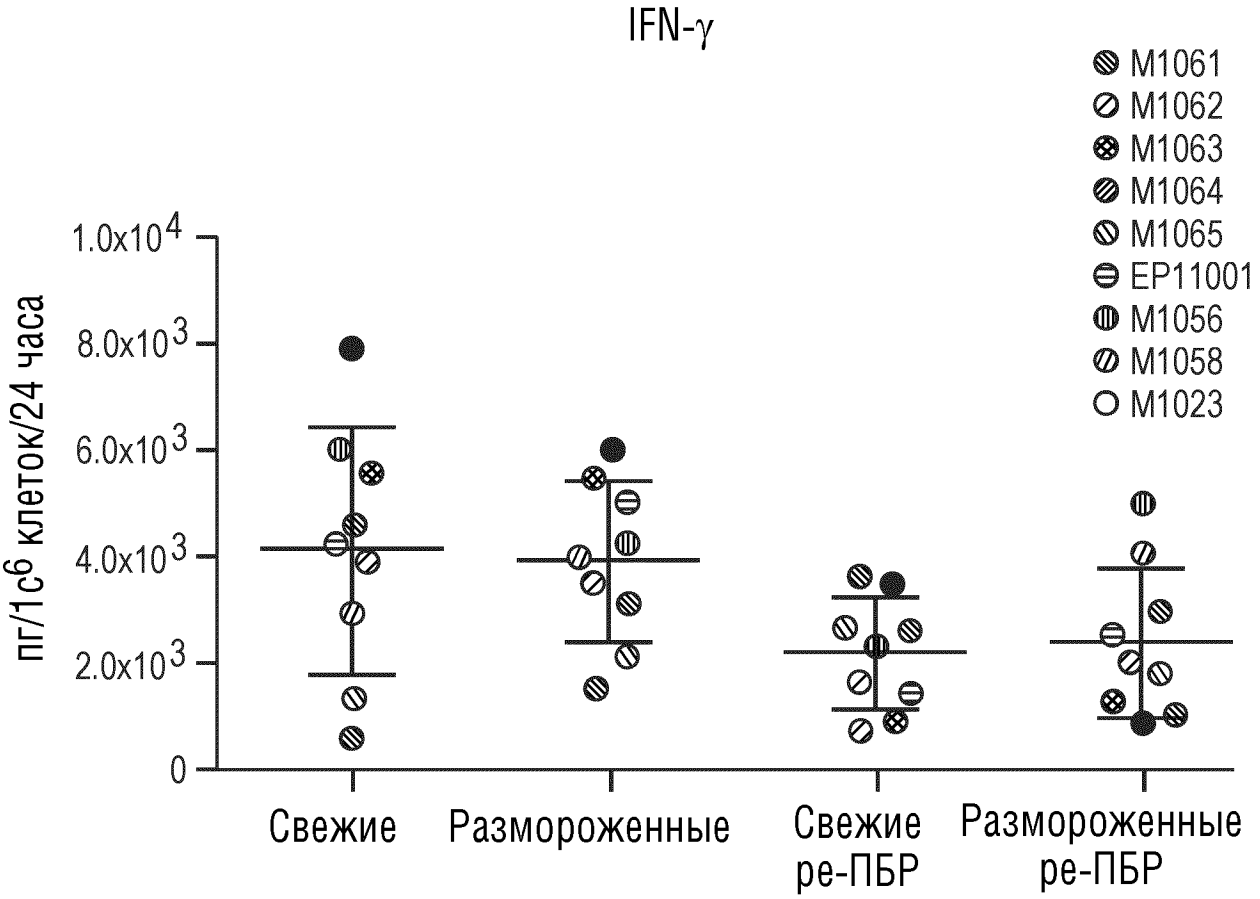
ФИГ.33В


L-глутамин
L-глутамин (ммоль/л)
0
1
2
3
4
5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T
Аммиак (NH3)
NH3 (ммоль/л)
0
1
2
3
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T
Натрий (NaCl)
Натрий (ммоль/л)
0
50
100
150
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T

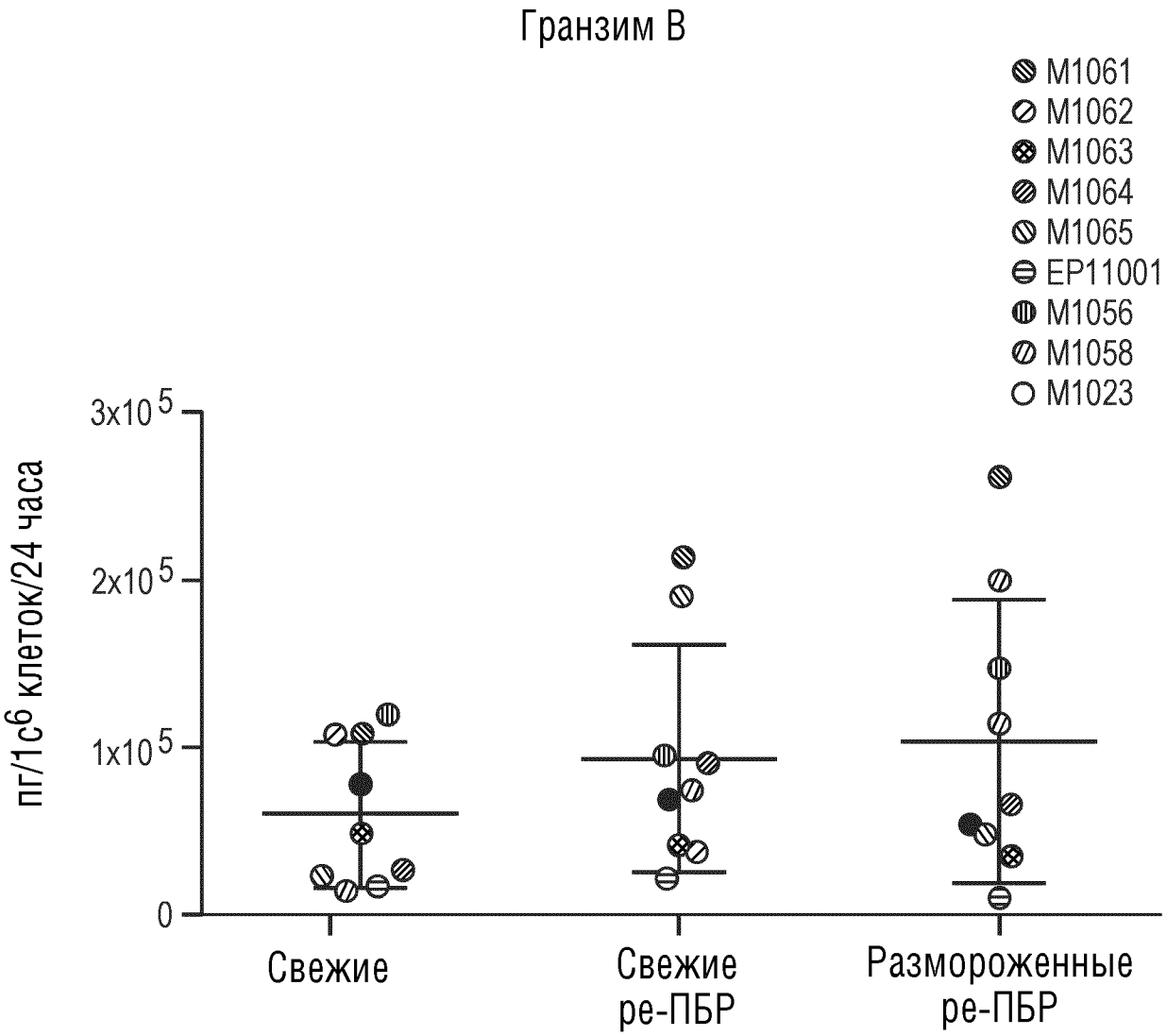
ФИГ.34


IL-2
4000
3000
2000
1000
0
IL-2 (МЕ/мл)
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
Количество дней в пре-ПБР
M1061T
M1062T
M1064T

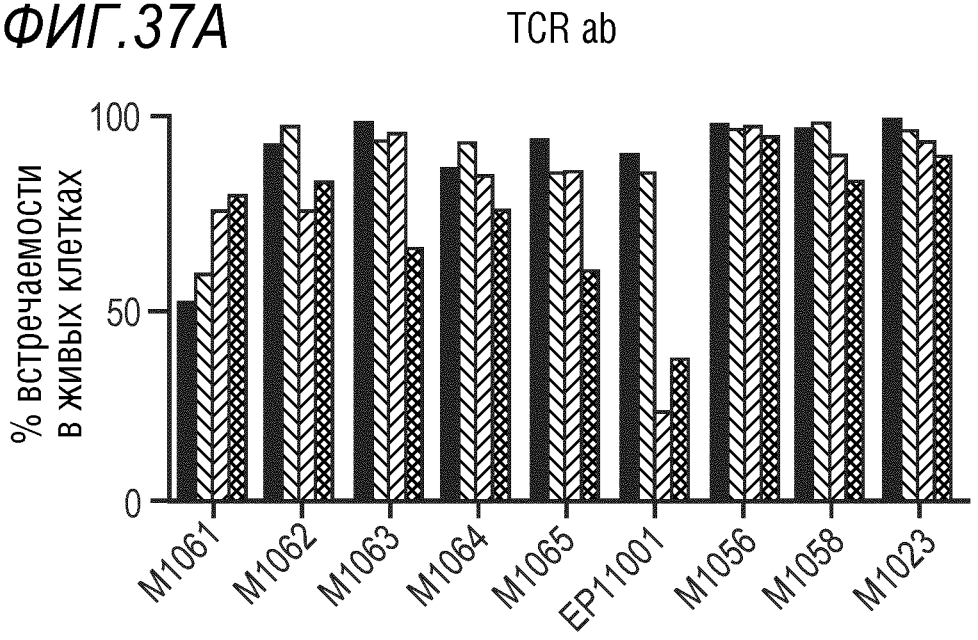
ФИГ.35


IFN-γ
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023
пг/1с6 клеток/24 часа
1.0x10^4
8.0x10^3
6.0x10^3
4.0x10^3
2.0x10^3
0
Свежие
Размороженные
Свежие ре-ПБР
Размороженные ре-ПБР

ФИГ.36

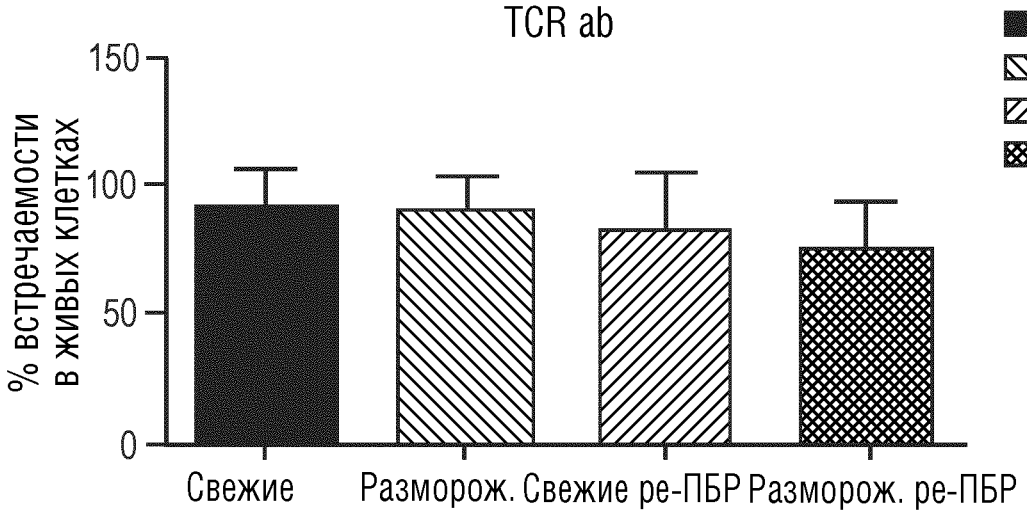

Гранзим B
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023
пг/1с6 клеток/24 часа
3x10 5
2x10 5
1x10 5
0
Свежие
Свежие
ре-ПБР
Размороженные
ре-ПБР

ФИГ.37A



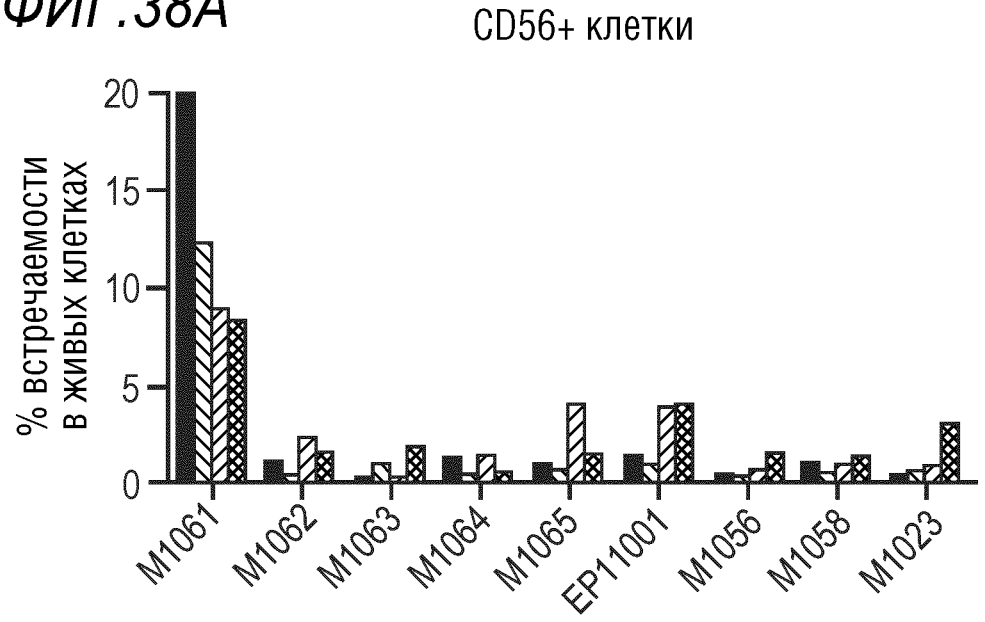
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,9582	0,2375
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.37B



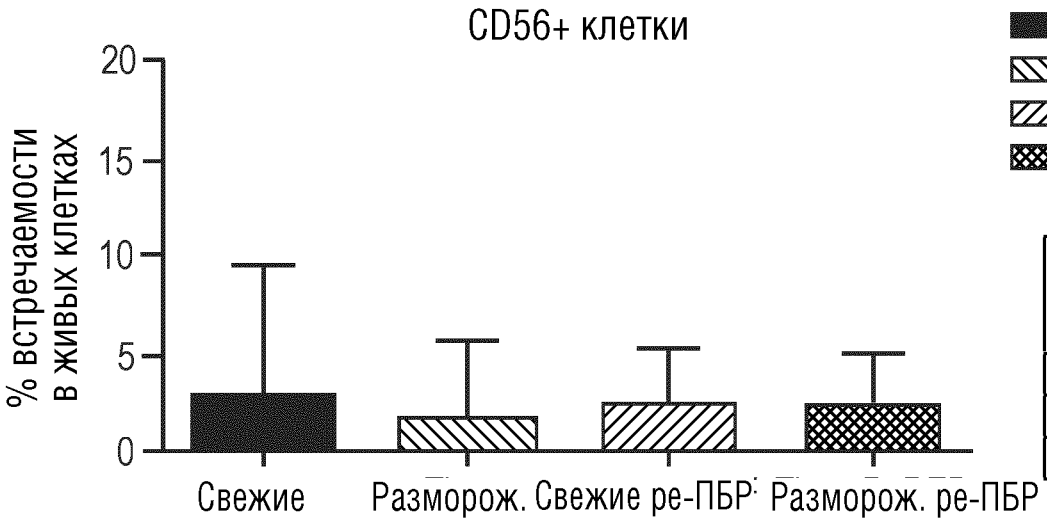
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	89,80	89,70	80,68	74,58
SD	15,01	12,28	22,57	17,79
SEM	5,004	4,093	7,525	5,929

ФИГ.38A



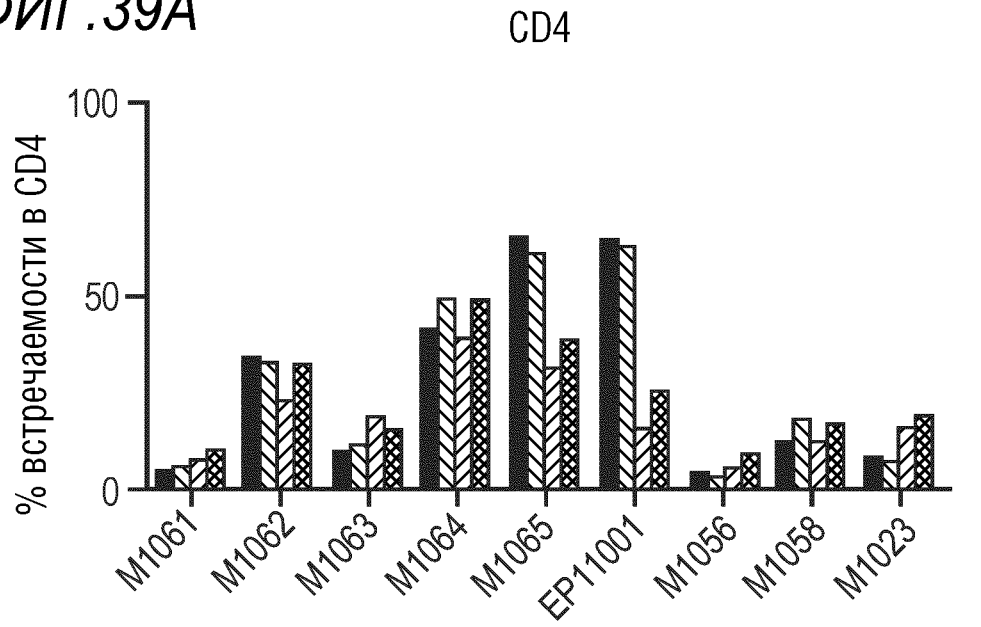
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,2739	0,8846
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.38B



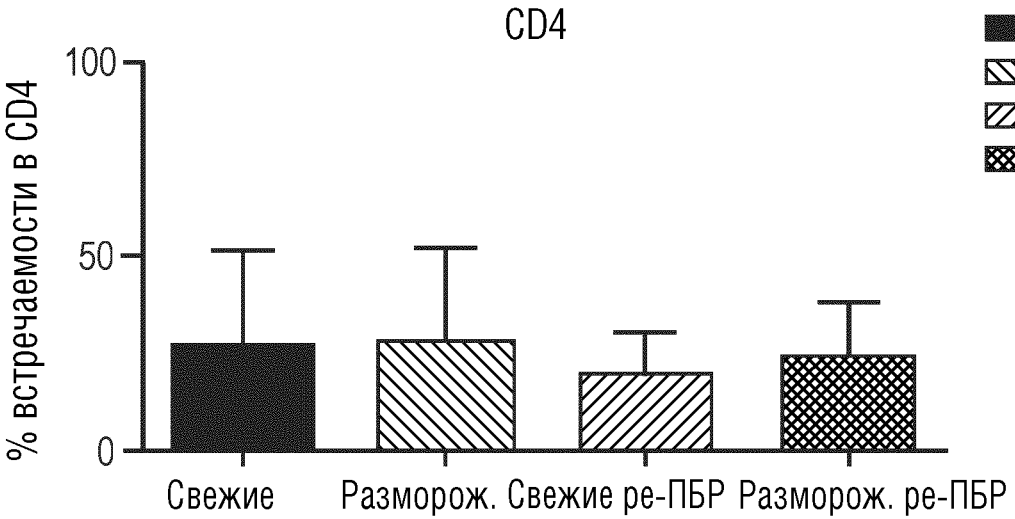
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	2,975	1,880	2,692	2,764
SD	6,589	3,843	2,774	2,350
SEM	2,196	1,281	0,9245	0,7832

ФИГ.39A



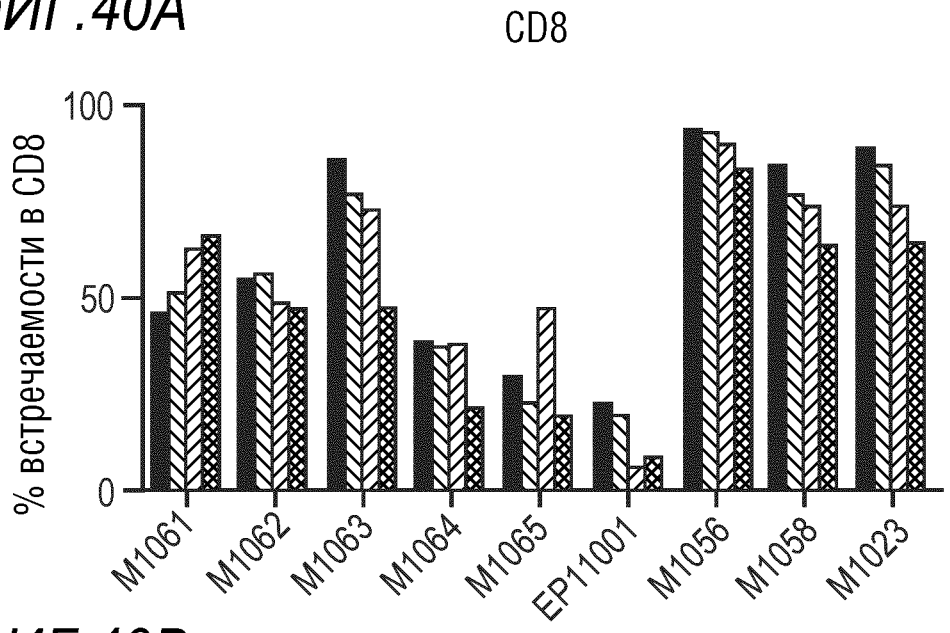
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,5218	0,0110
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.39B



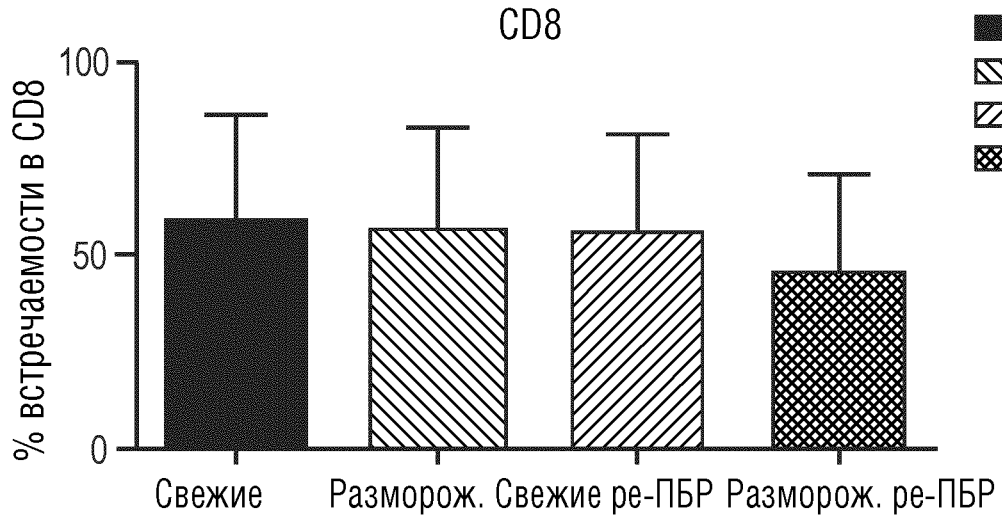
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	27,28	28,08	19,42	24,49
SD	24,92	24,28	10,84	13,63
SEM	8,308	8,094	3,612	4,542

ФИГ.40A



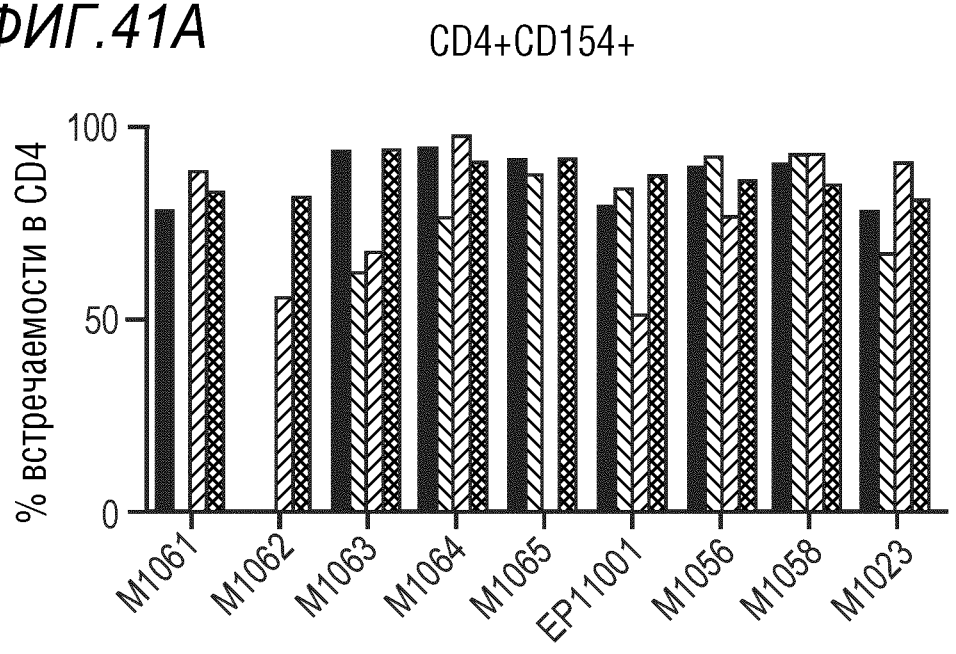
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,952	0,0264
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Да

ФИГ.40B



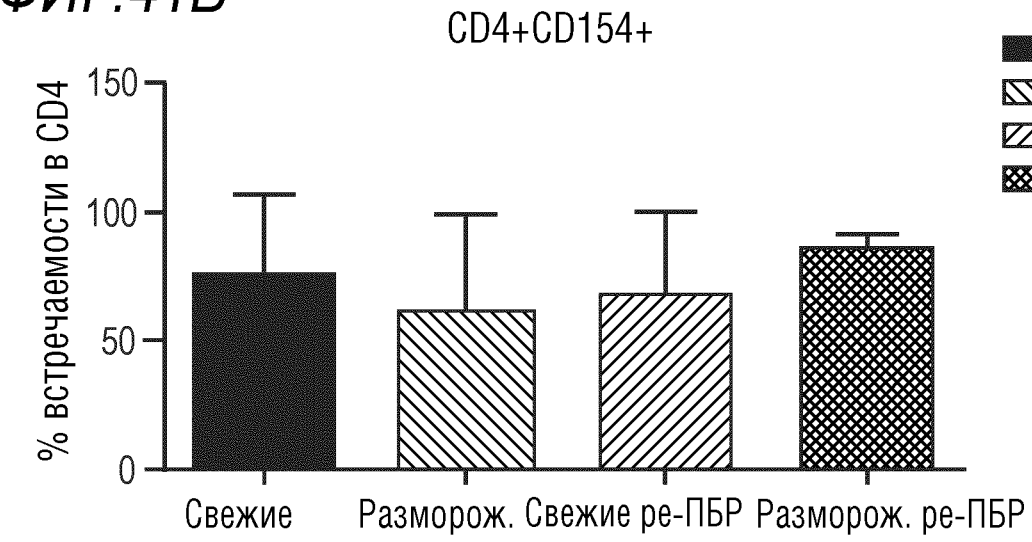
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	60,13	57,13	57,16	46,75
SD	28,04	27,06	25,32	25,2
SEM	9,348	9,021	8,441	8,401

ФИГ.41A



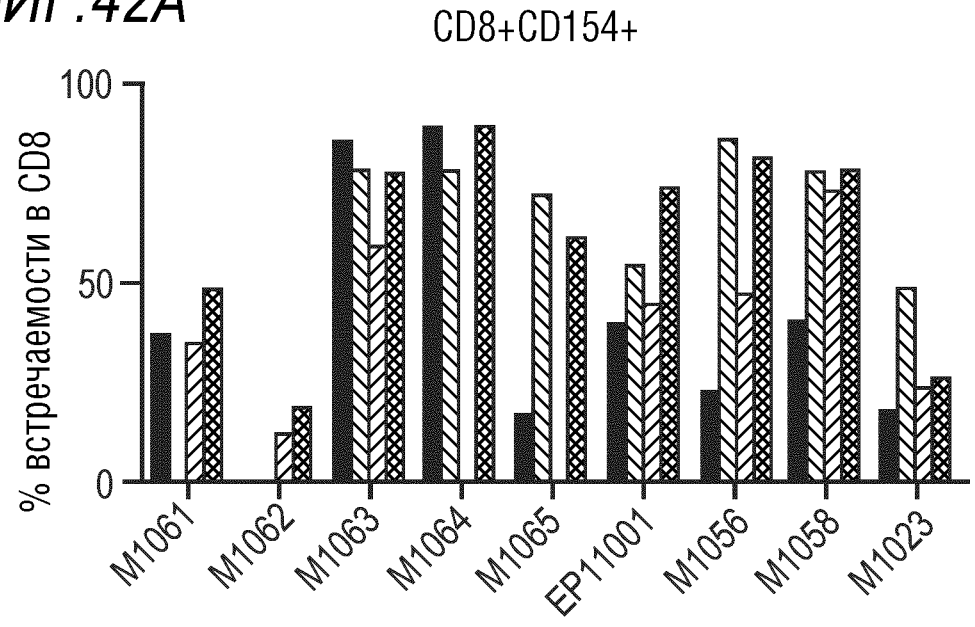
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,1337	0,1416
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.41B



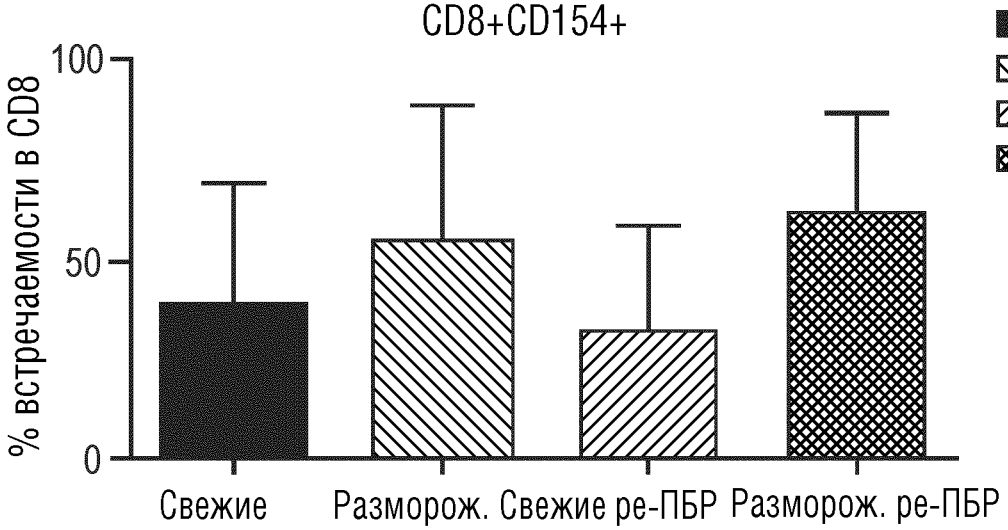
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	77,03	62,23	69,18	86,83
SD	29,6	36,79	30,6	4,255
SEM	9,867	12,26	10,2	1,418

ФИГ.42A



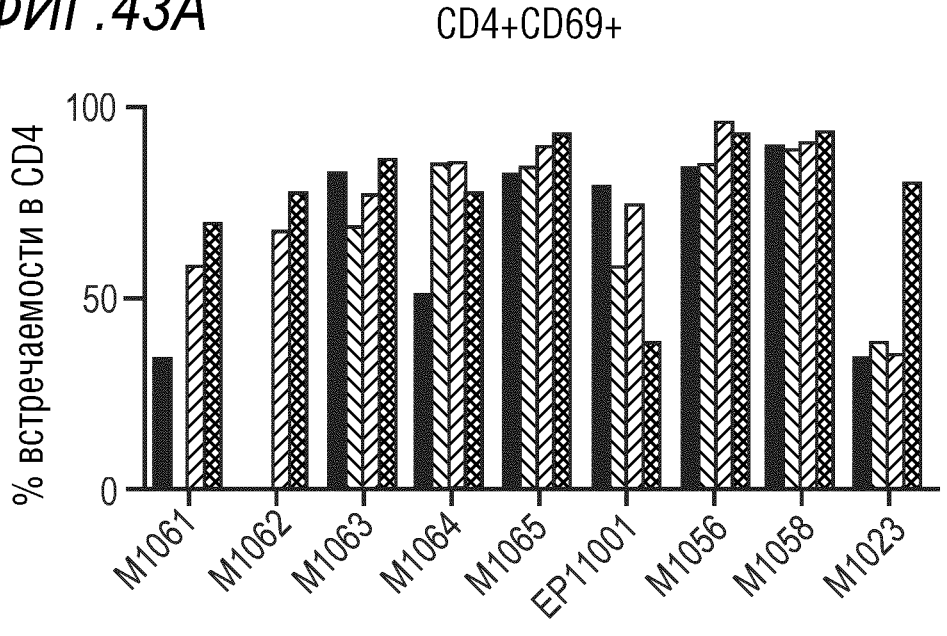
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,0534	0,0181
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.42B



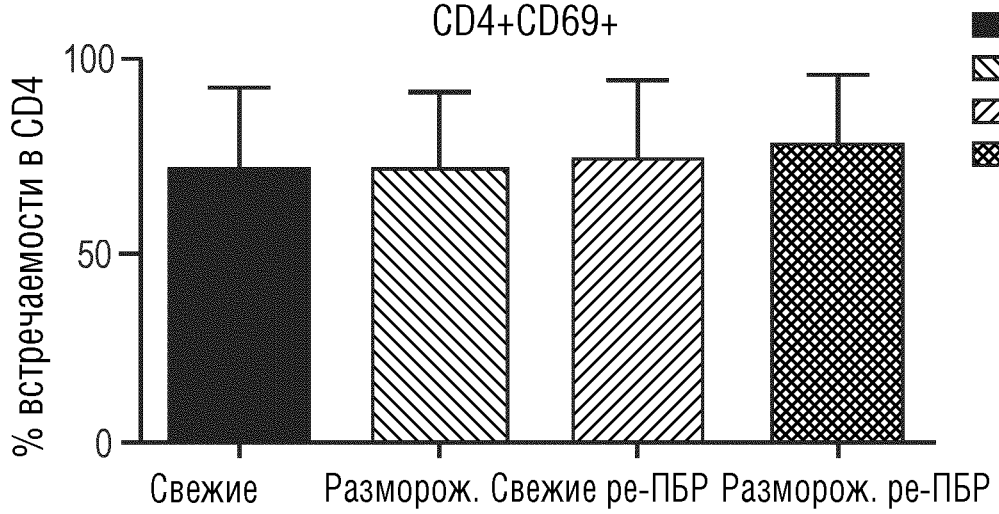
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	44,79	70,9	33,07	62,18
SD	30,75	13,84	25,9	25,23
SEM	11,62	5,23	8,633	8,41

ФИГ.43A



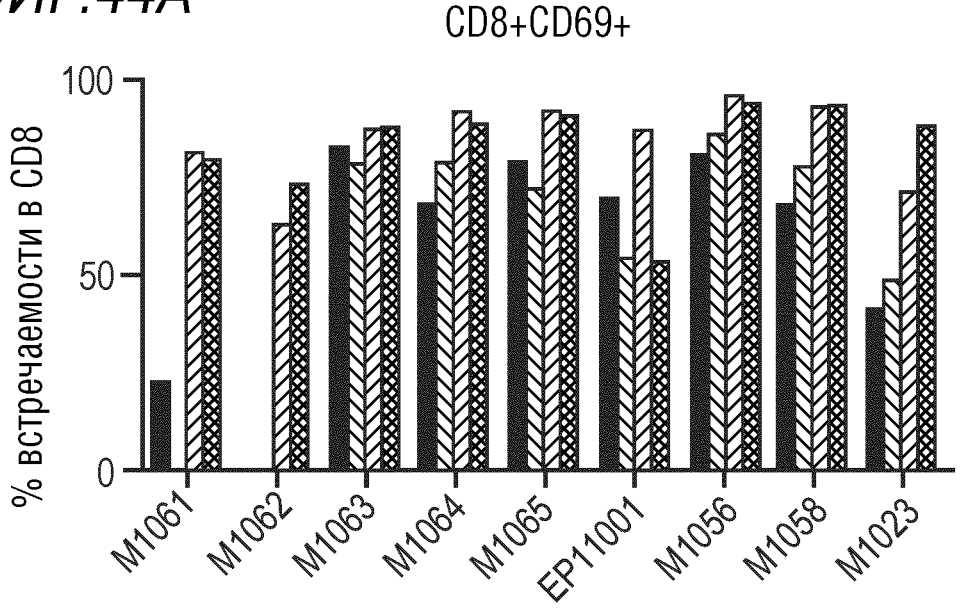
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,8951	0,8243
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.43B



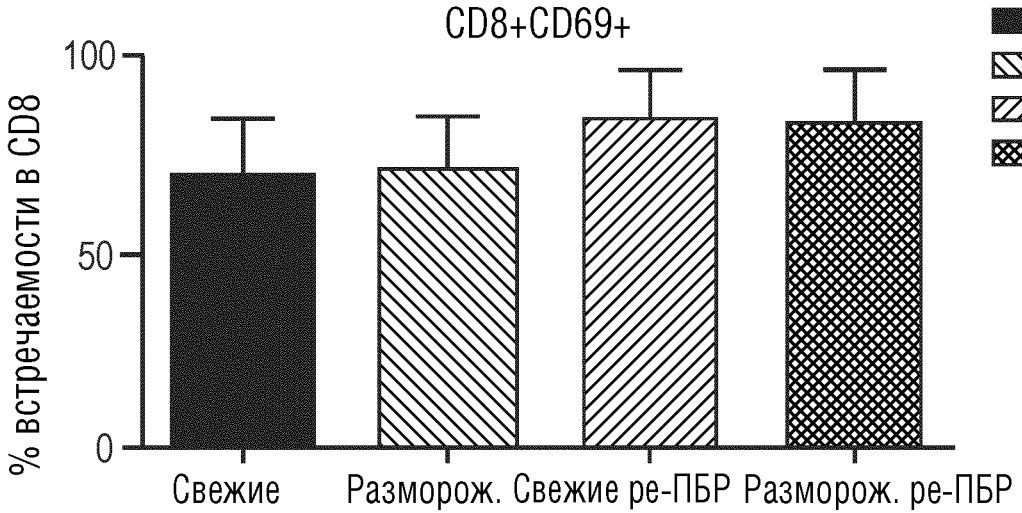
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	71,76	72,64	75,2	79,14
SD	20,84	18,54	19,2	17,25
SEM	7,876	7,009	6,4	5,749

ФИГ.44A



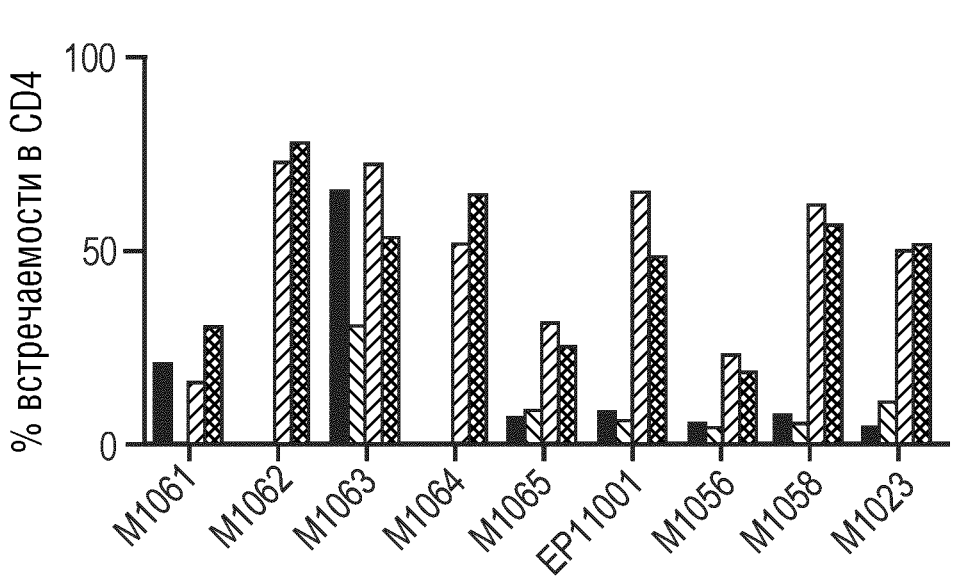
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,6788	0,7638
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.44B



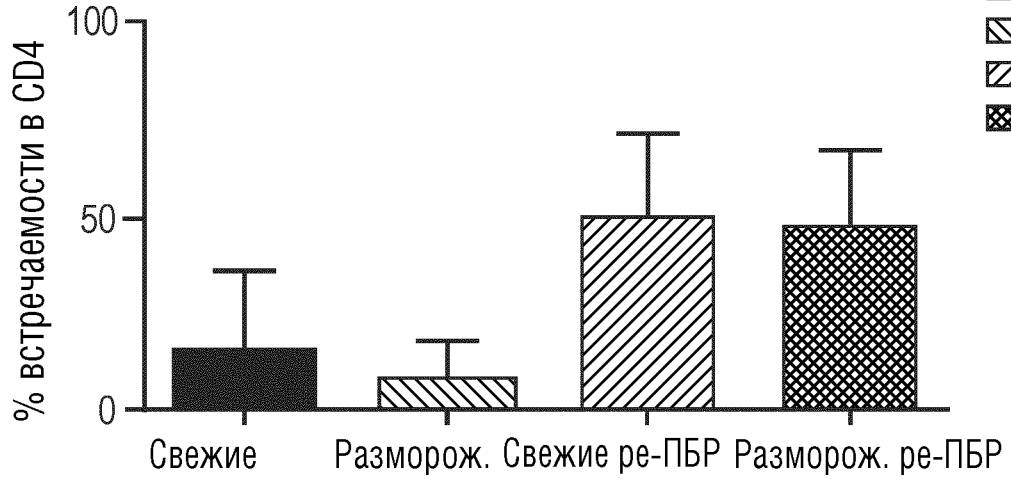
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	56,8	55,14	84,66	83,19
SD	29,12	33,48	11,1	13,15
SEM	9,707	11,16	3,699	4,383

ФИГ.45A



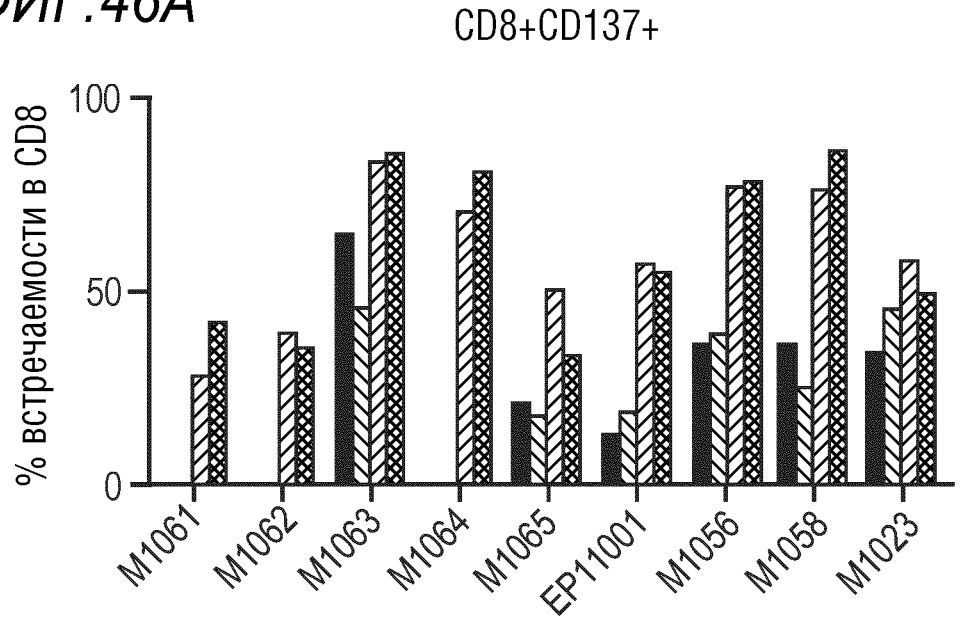
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,2096	0,3686
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.45B



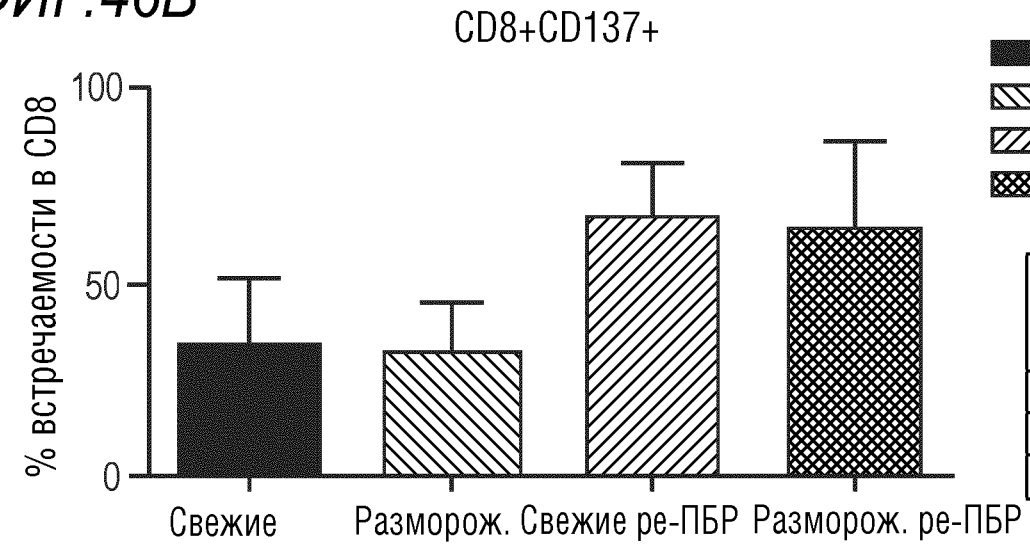
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	14,29	7,623	48,9	45,05
SD	21,43	9,778	23,08	19,54
SEM	7,577	3,457	8,159	6,908

ФИГ.46A



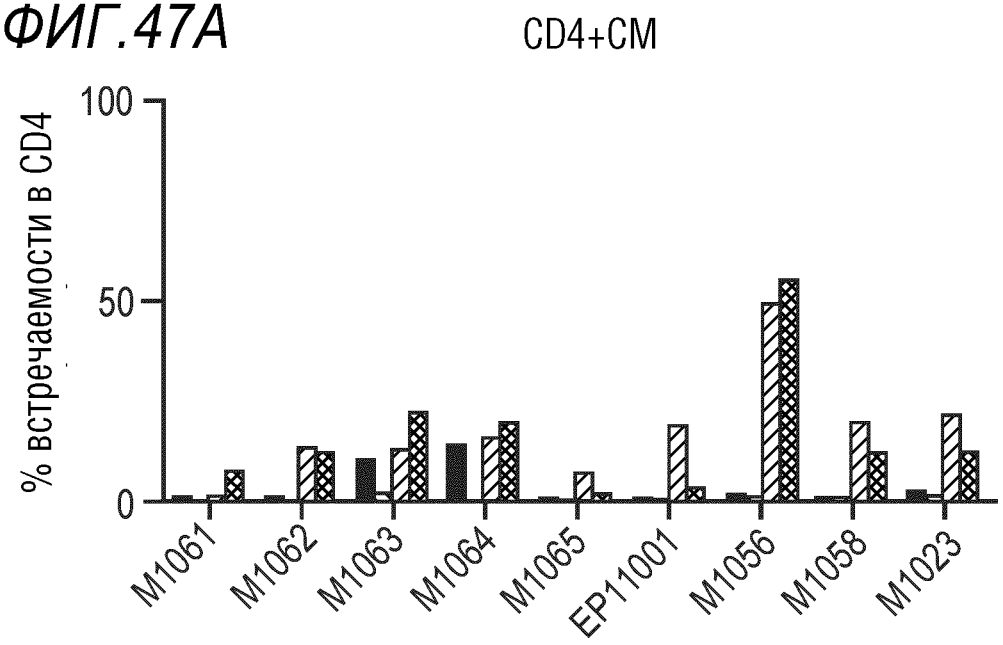
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,6563	0,5484
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.46B



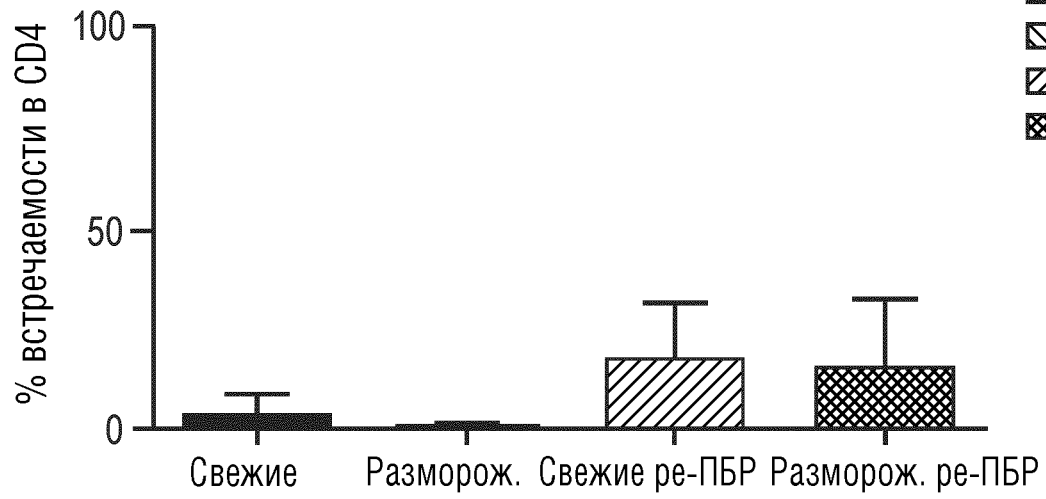
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	34,03	31,88	67,47	65,03
SD	17,53	13,05	13,71	21,91
SEM	7,156	5,328	5,597	8,945

ФИГ.47A



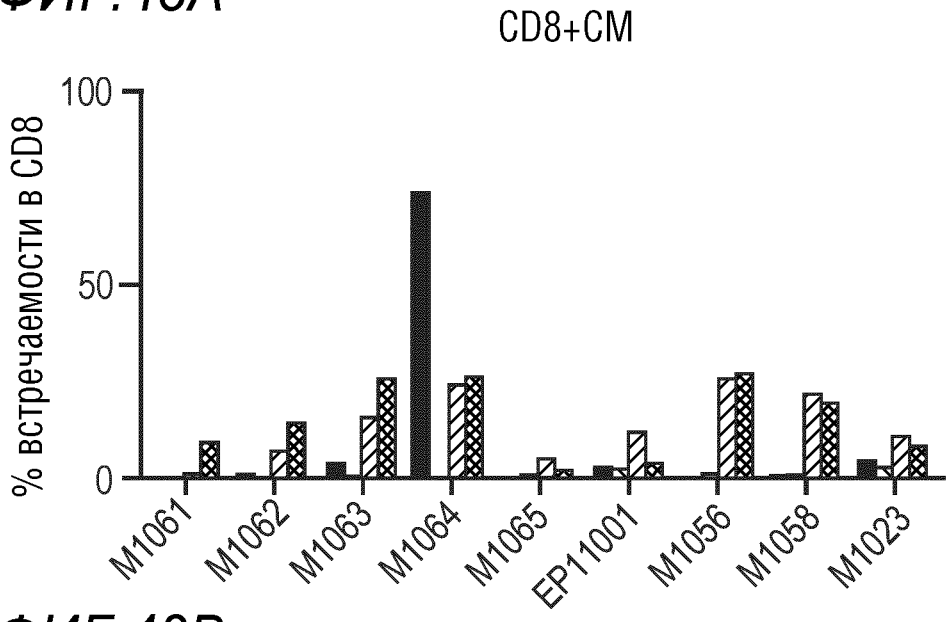
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,1658	0,5535
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.47B



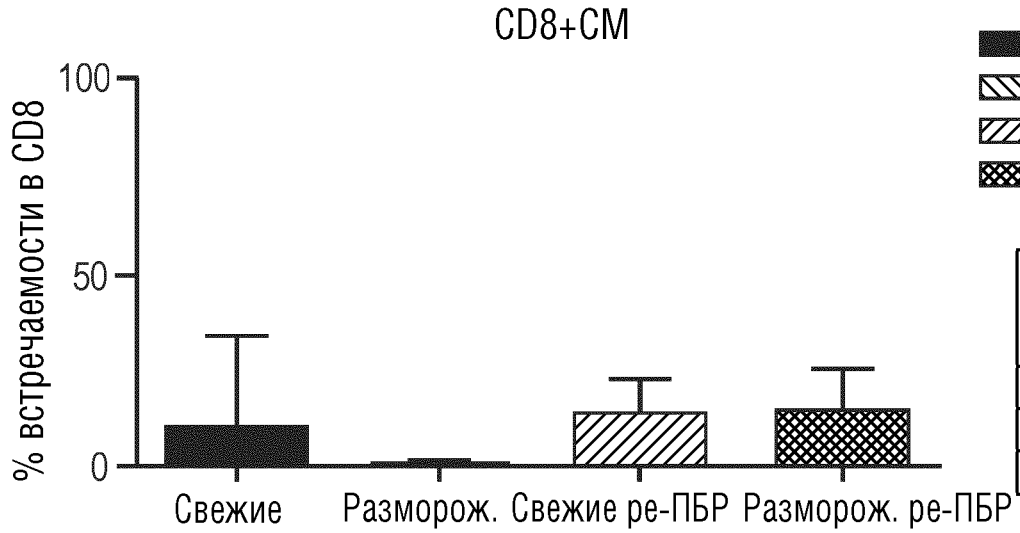
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	3,668	1,043	18,13	16,46
SD	5,094	0,8127	13,37	16,02
SEM	1,698	0,2709	4,456	5,341

ФИГ.48A



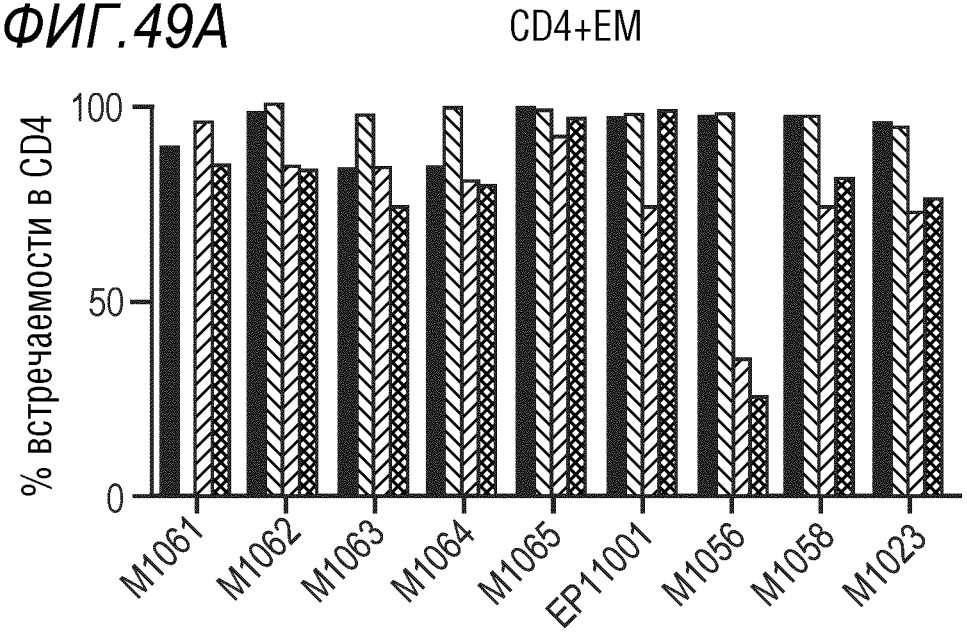
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,3086	0,5768
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.48B



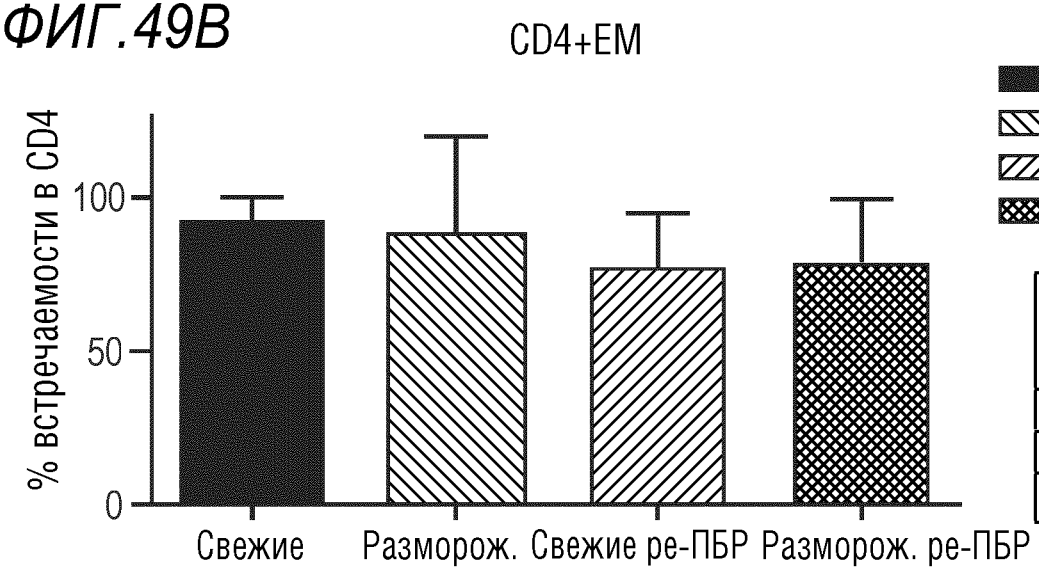
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	9,529	0,7811	13,69	14,87
SD	23,92	0,7532	8,678	9,912
SEM	7,972	0,2511	2,893	3,304

ФИГ.49A



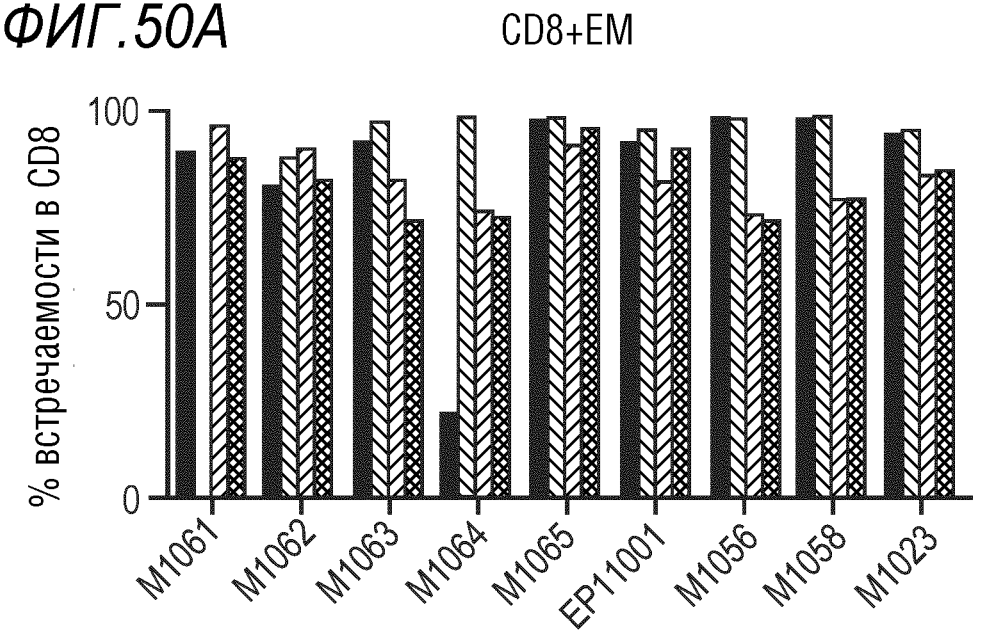
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,5539	0,8411
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.49B



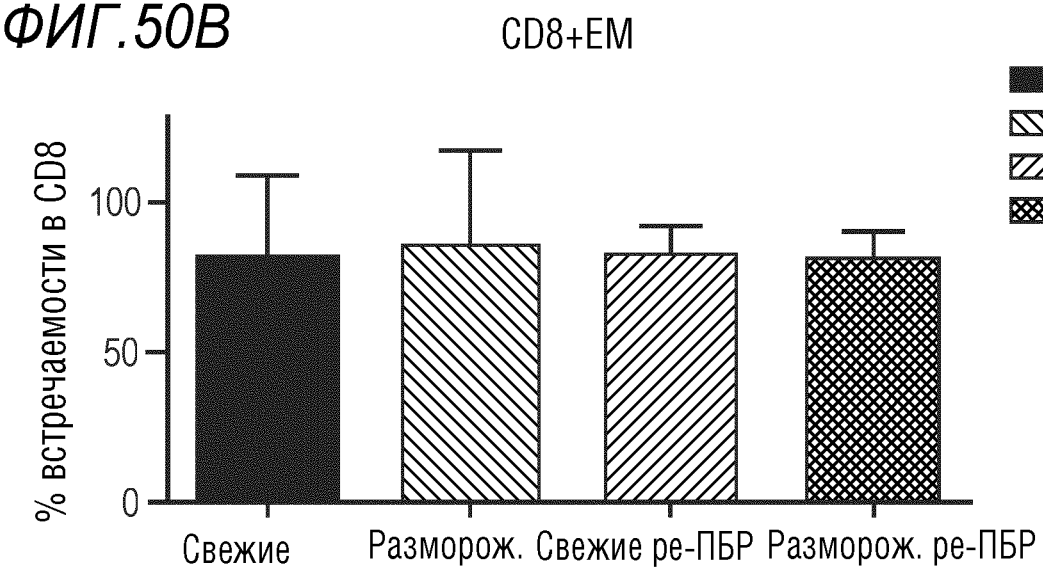
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	93,61	87,04	77,13	77,92
SD	6,055	32,67	17,25	21,38
SEM	2,018	10,89	5,751	7,127

ФИГ.50A



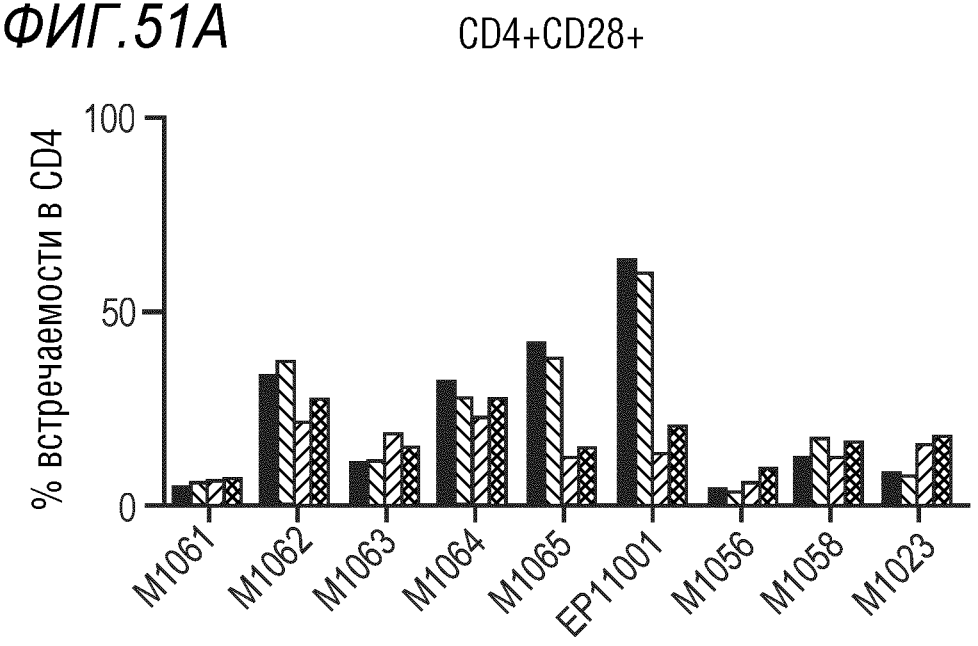
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,9546	0,4107
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.50B



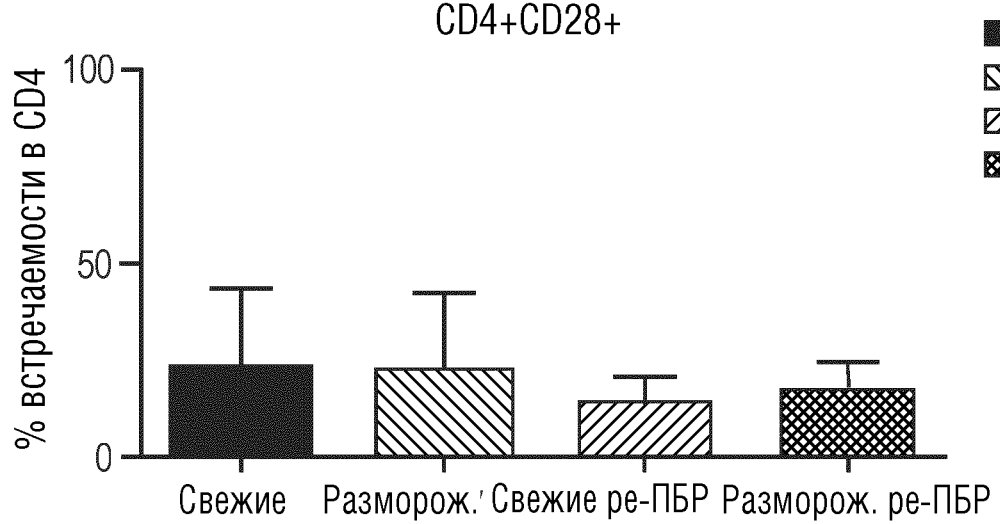
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	84,94	85,77	83,77	81,93
SD	24,74	32,36	8,17	8,75
SEM	8,246	10,79	2,723	2,917

ФИГ.51A



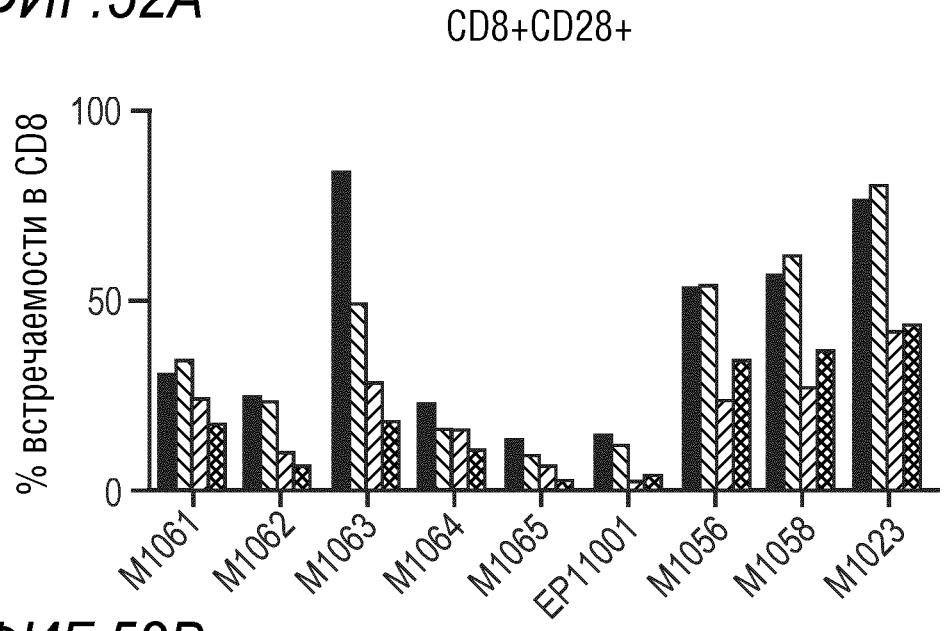
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,8745	0,0205
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Да

ФИГ.51B



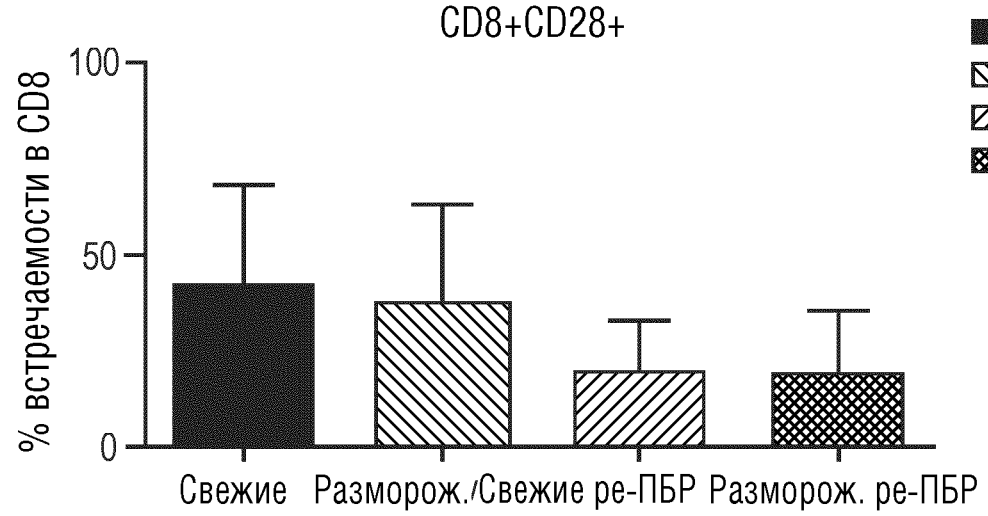
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	23,28	23,1	14,39	17,39
SD	20,43	19,02	5,915	7,078
SEM	0,81	0,341	1,372	2,359

ФИГ.52A



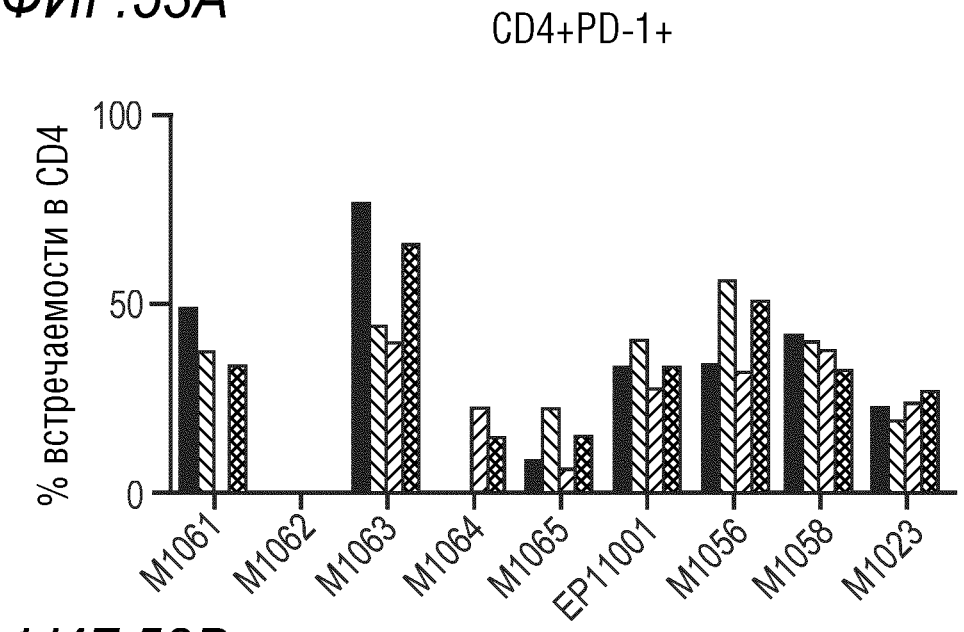
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,3668	0,794
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.52B



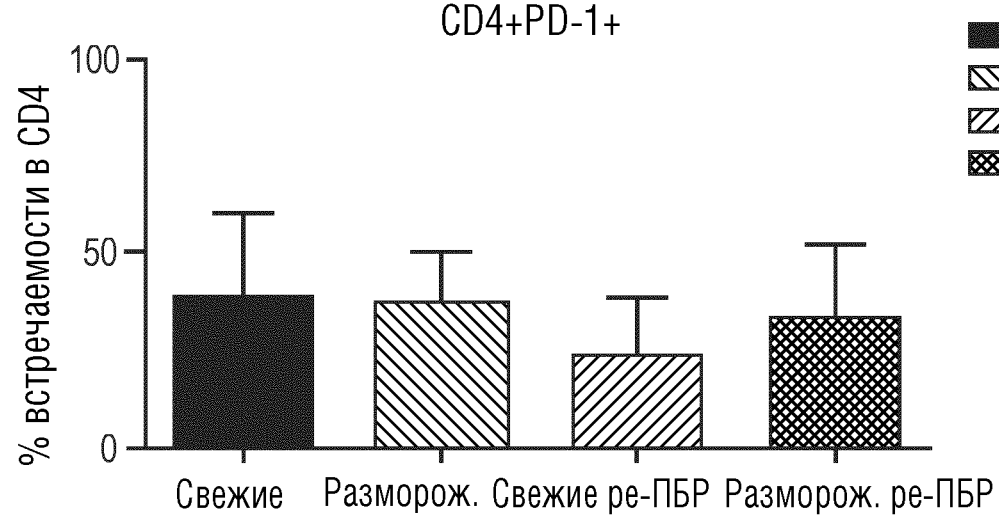
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	41,66	37,75	20,1	19,45
SD	26,61	25,24	12,53	15,39
SEM	8,871	8,415	4,176	5,13

ФИГ.53А



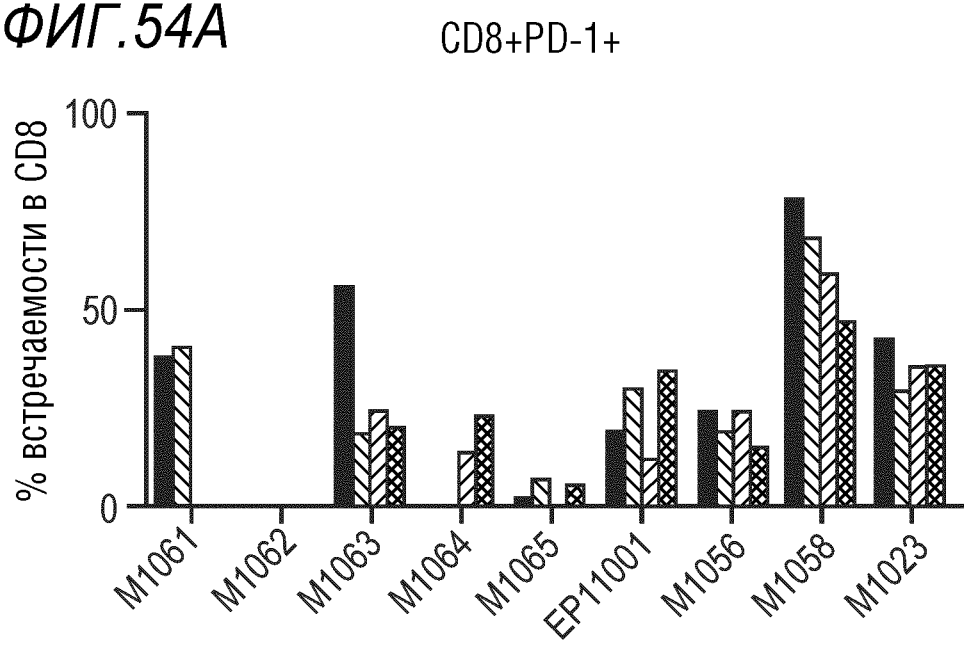
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,9089	0,0912
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.53В



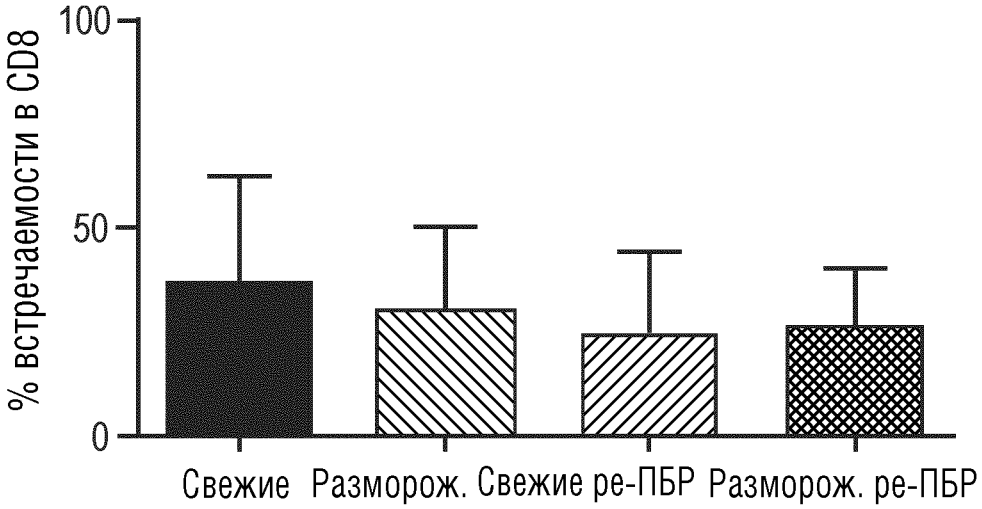
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	37,85	37,03	24,13	34,34
SD	21,7	12,75	14,27	17,29
SEM	8,202	4,819	5,047	6,113

ФИГ.54A



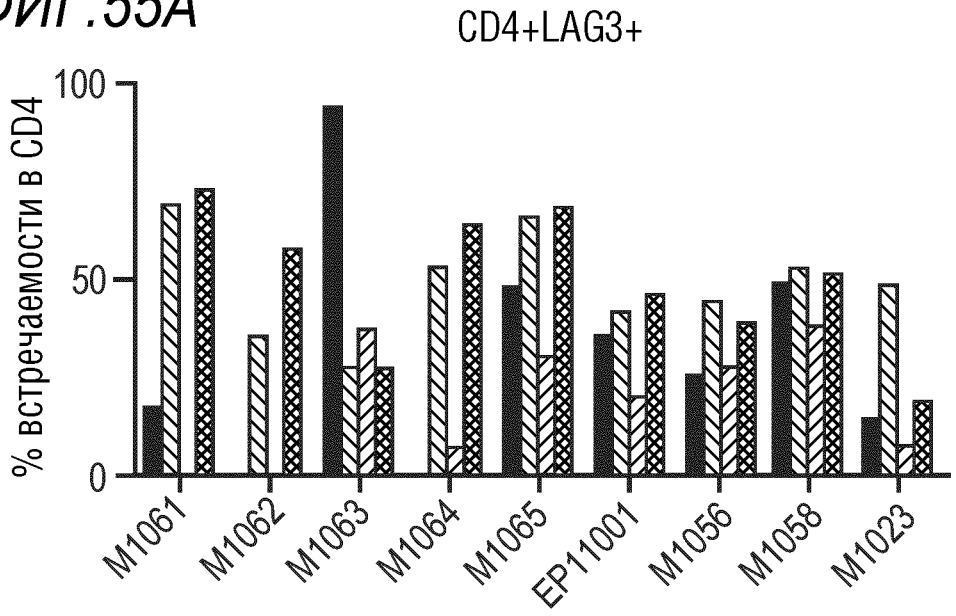
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,3144	0,7668
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.54B



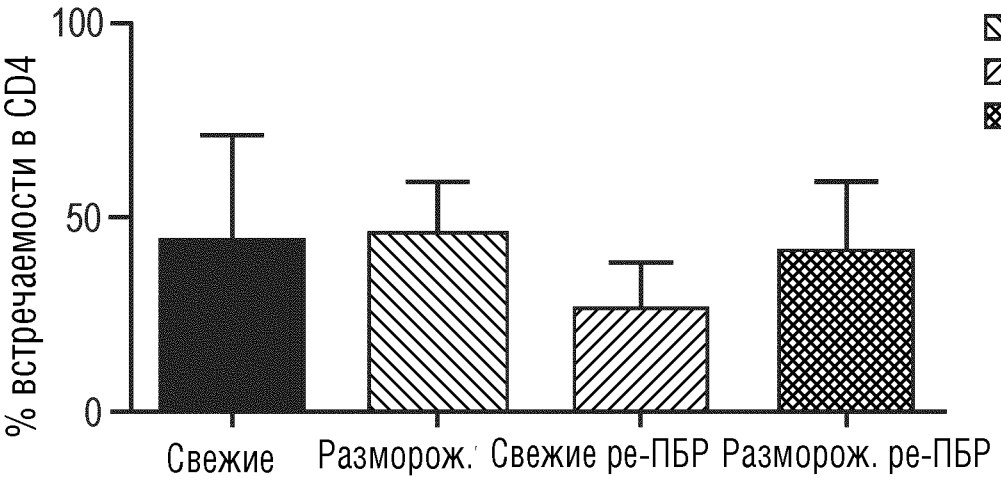
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	36,96	30,22	24,63	26,03
SD	25,33	20	19,15	14,05
SEM	9,574	7,558	7,238	5,309

ФИГ.55A



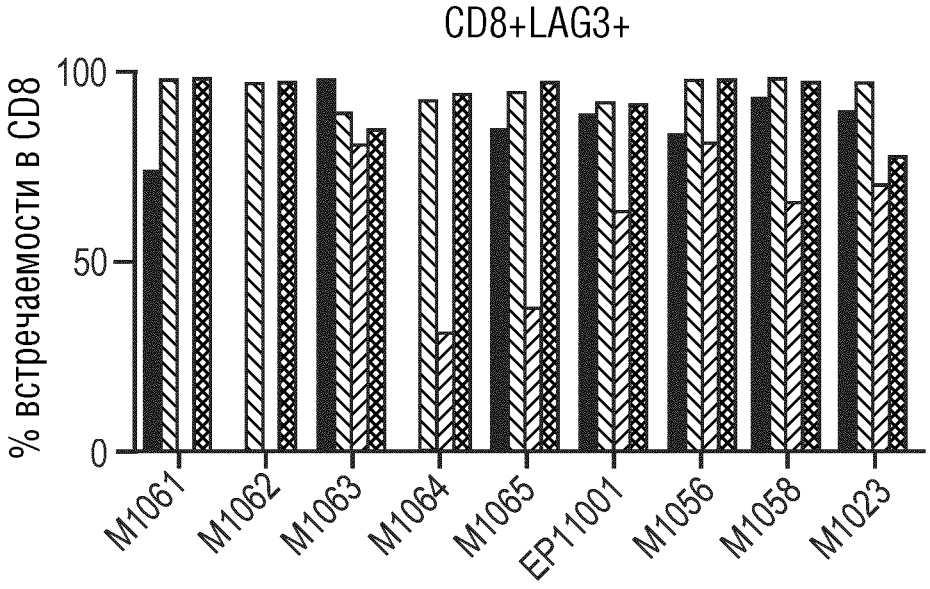
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,5234	0,0753
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.55B



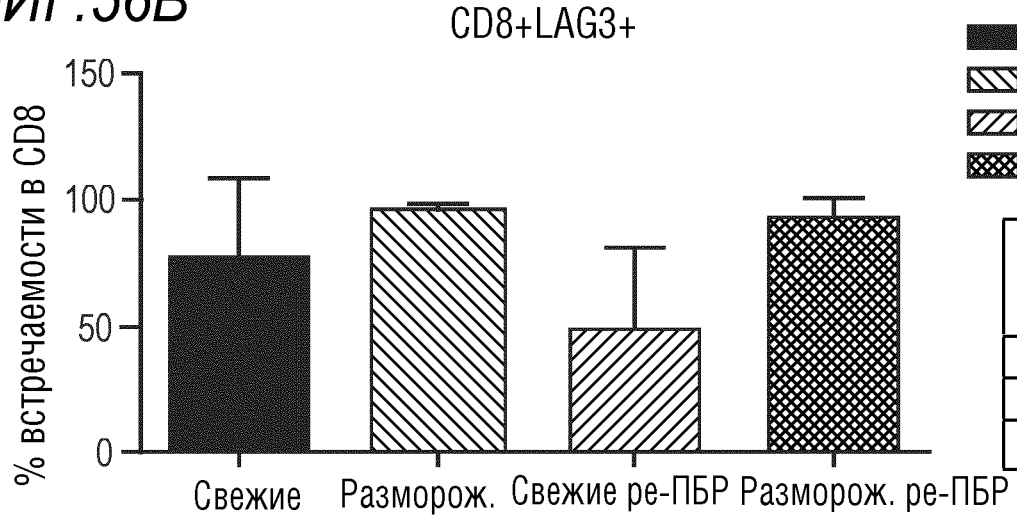
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	40,16	49,51	26,83	41,55
SD	27,15	14,38	11,5	17,87
SEM	10,26	5,435	4,695	7,297

ФИГ.56A



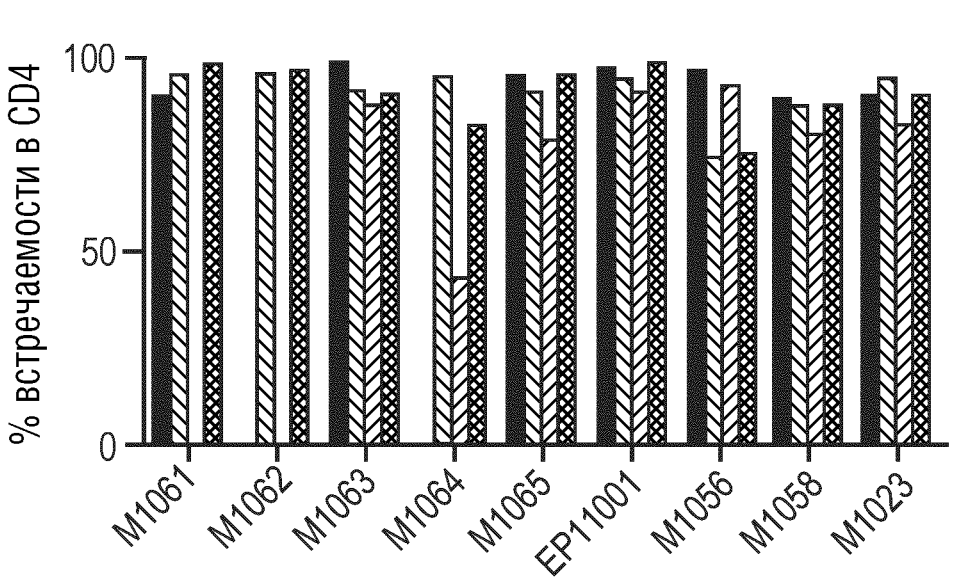
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,0884	0,0154
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Да

ФИГ.56B



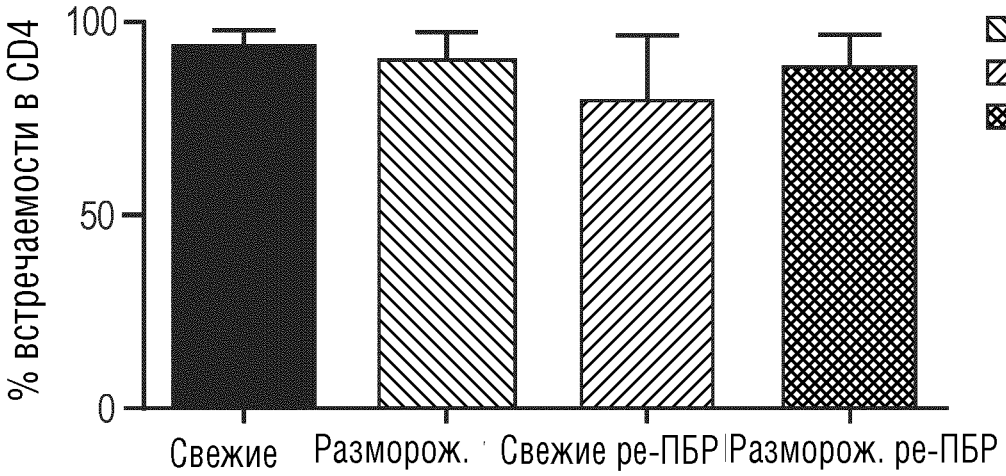
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	87,74	95,59	62,21	92,13
SD	7,821	3,375	19,74	7,773
SEM	2,956	1,276	7,459	2,938

ФИГ.57A



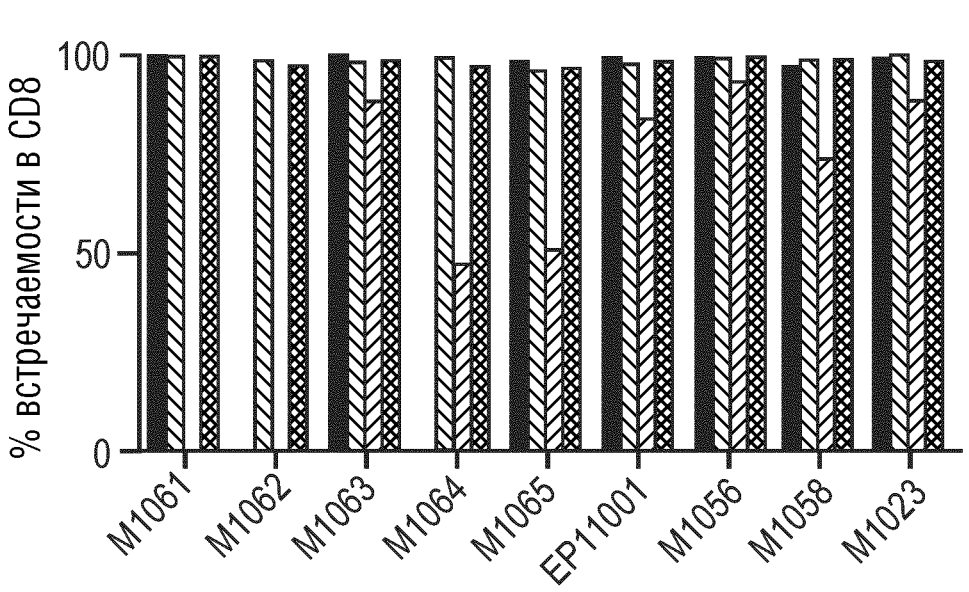
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,2914	0,2007
Сводное	н/з	н/з
Значимое	Нет	Нет

ФИГ.57B



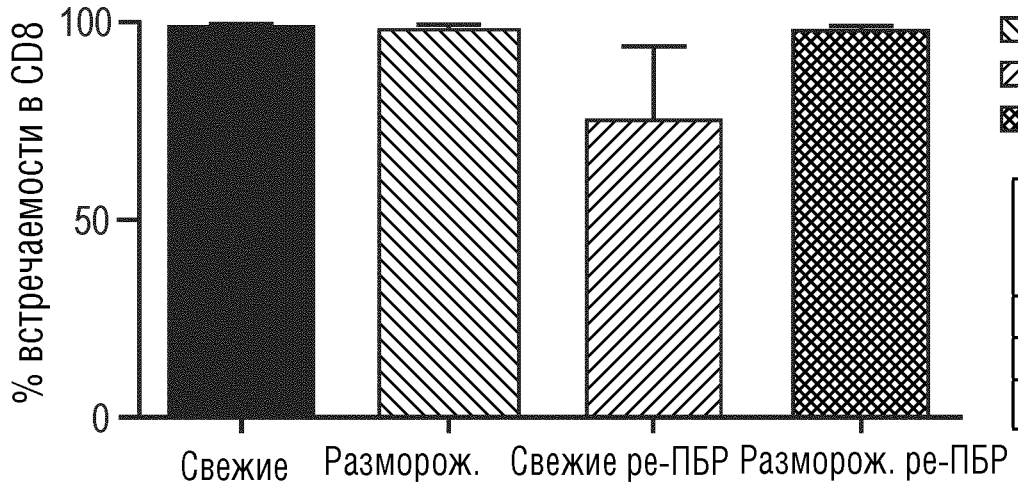
	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	93,56	89,49	79,43	88,6
SD	3,993	7,463	16,86	7,818
SEM	1,509	2,821	6,371	2,955

ФИГ.58A



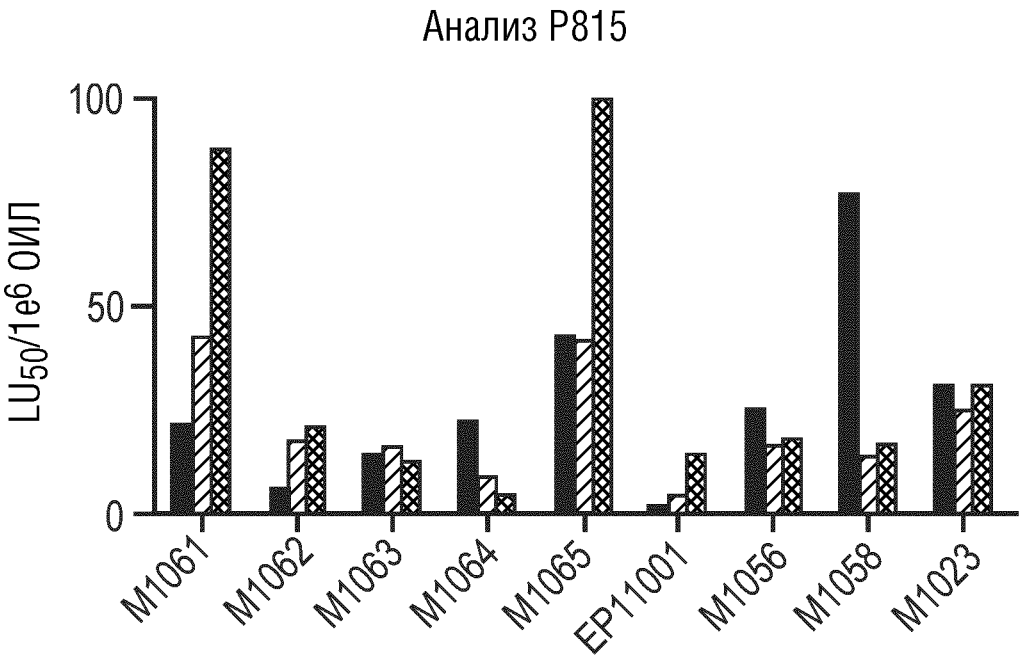
Критерий Стьюдента	Свежие ОИЛ против размороженных ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,1835	0,0118
Сводное	н/з	*
Значимое	Нет	Да

ФИГ.58B

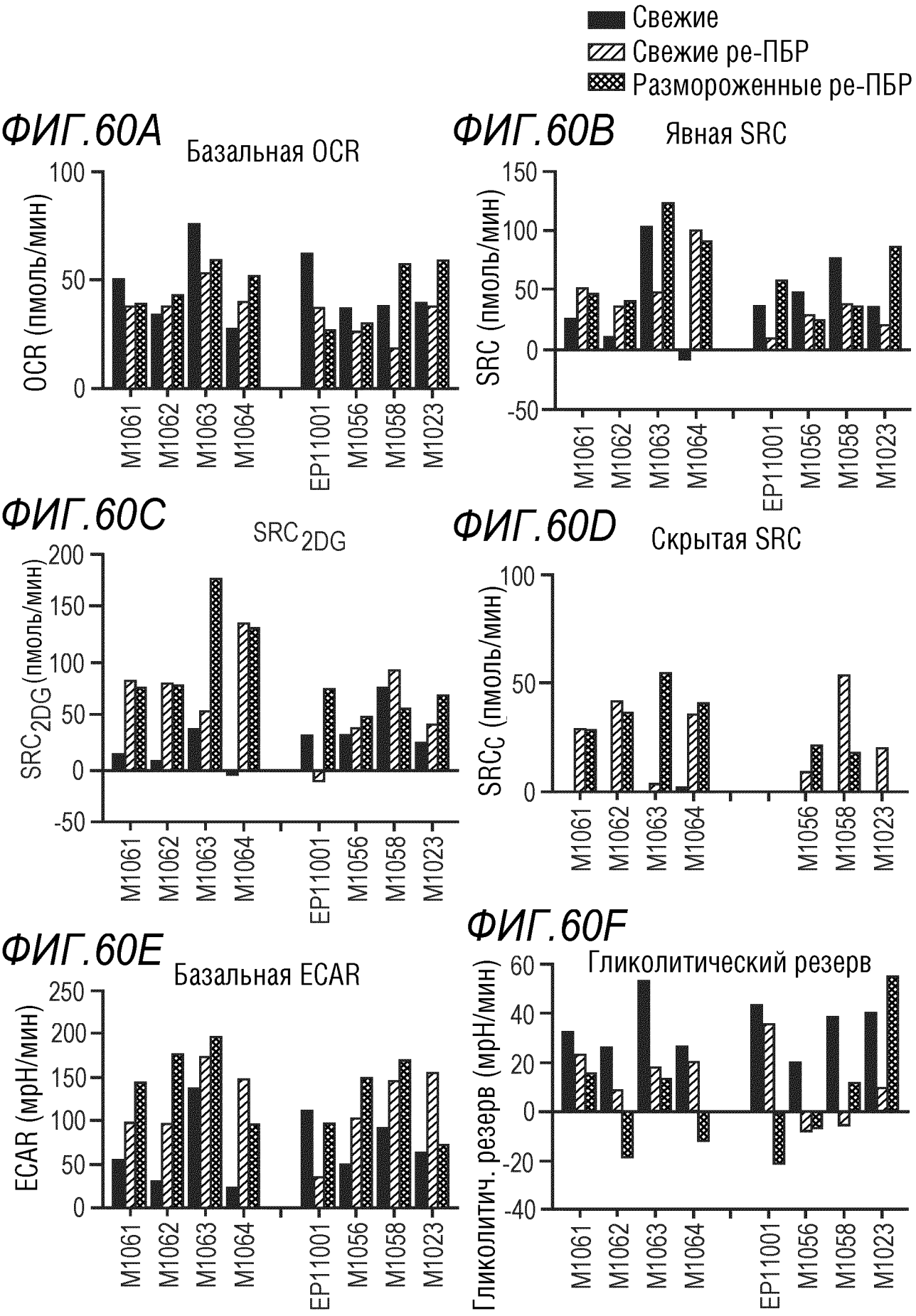


	Свежие ОИЛ	Размороженные ОИЛ	Свежие ре-ПБР ОИЛ	Размороженные ре-ПБР ОИЛ
Среднее	76,34	97,44	58,19	97,68
SD	43,29	1,292	36,79	1,158
SEM	14,43	0,4308	12,26	0,3861

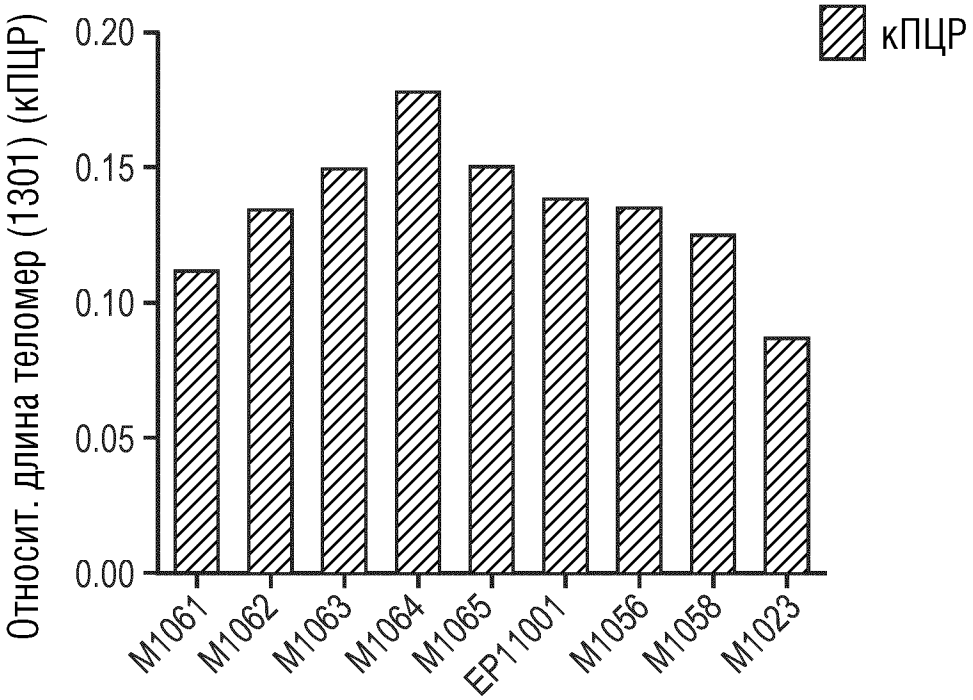
ФИГ.59



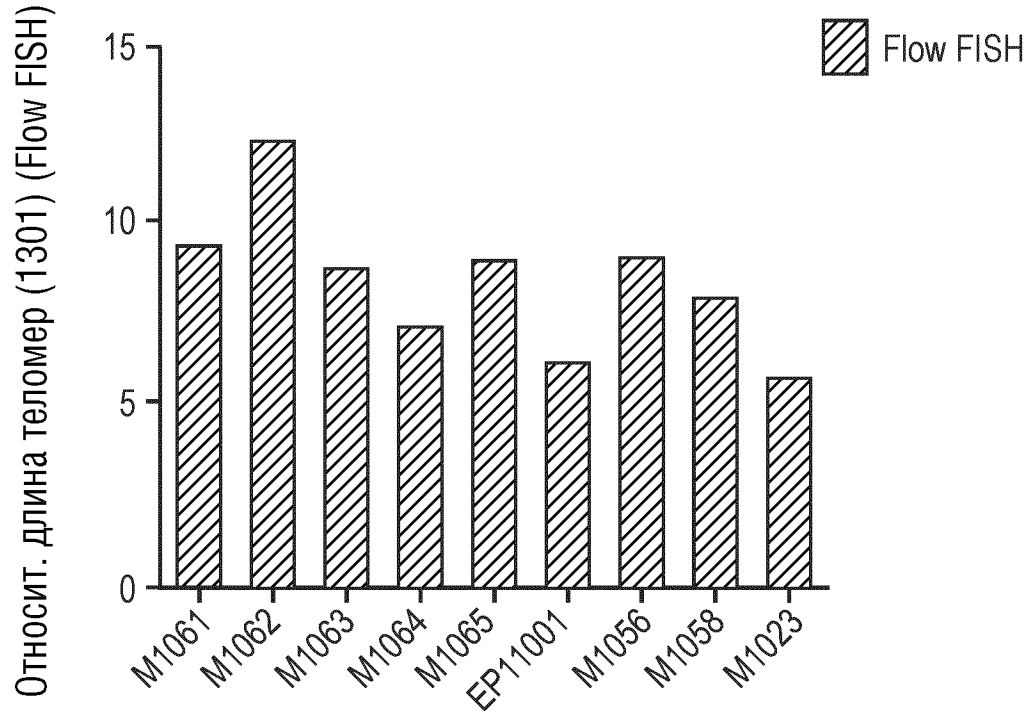
Критерий Стьюдента	Свежие ре-ПБР ОИЛ против размороженных ре-ПБР ОИЛ
P-значение	0,3126
Сводное	н/з
Значимое	Нет


Свежие
Свежие ре-ПБР
Размороженные ре-ПБР
ФИГ.60A
Базальная OCR
OCR (пмоль/мин)
100
50
0
M1061
M1062
M1063
M1064
EP11001
M1056
M1058
M1023
ФИГ.60B
Явная SRC
SRC (пмоль/мин)
150
100
50
0
-50
ФИГ.60C
SRC2DG
SRC2DG (пмоль/мин)
200
150
100
50
0
-50
ФИГ.60D
Скрытая SRC
SRCC (пмоль/мин)
ФИГ.60E
Базальная ECAR
ECAR (мрН/мин)
250
200
150
100
50
0
ФИГ.60F
Гликолитический резерв
Гликолитич. резерв (мрН/мин)
60
40
20
0
-20
-40

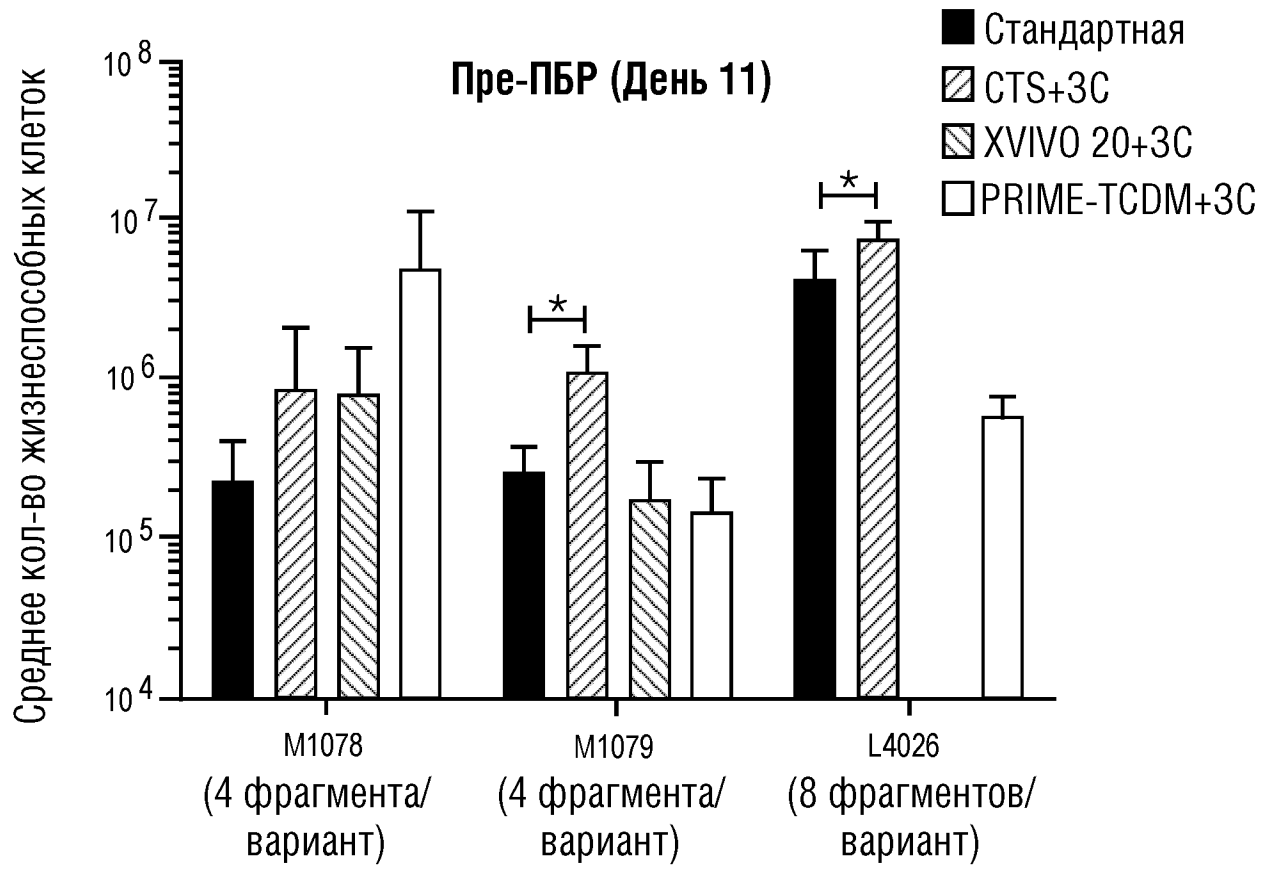
ФИГ.61A



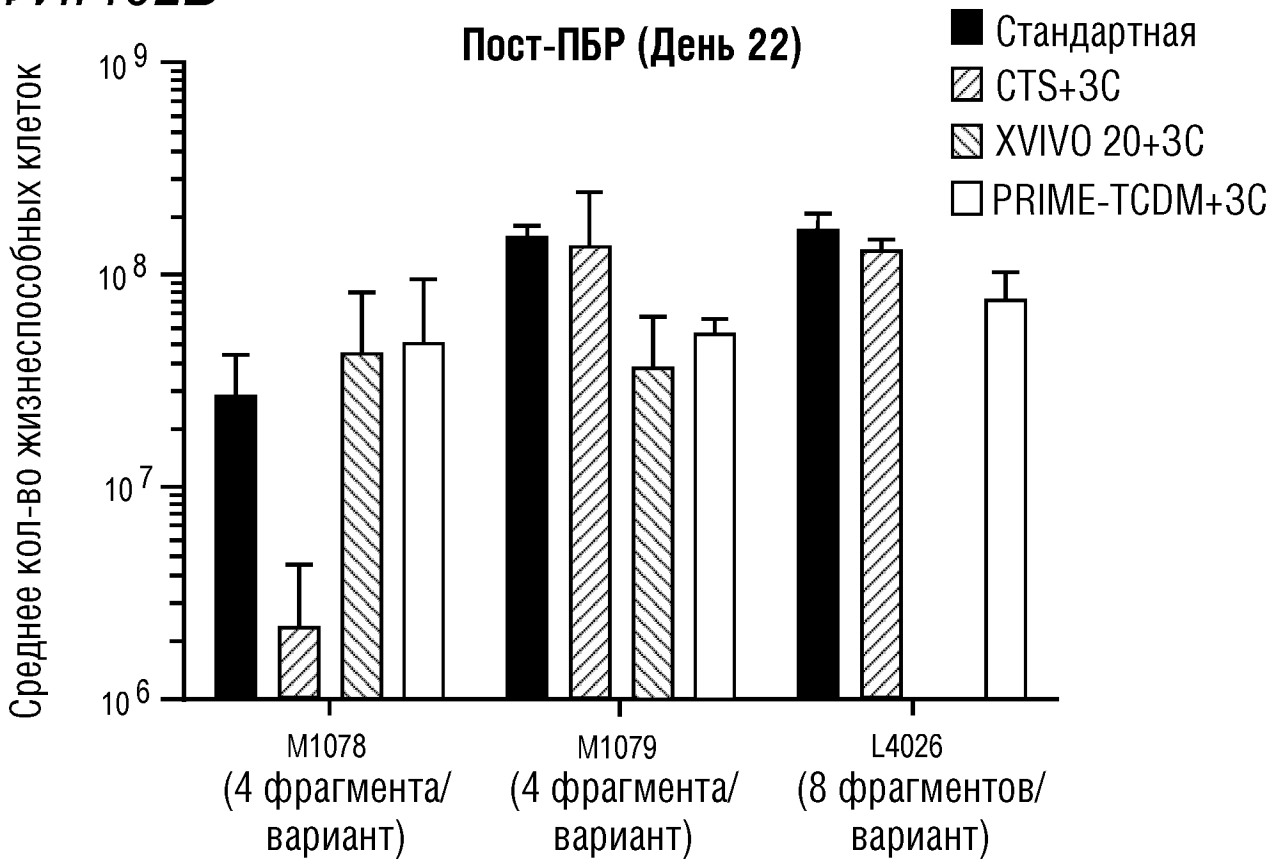
ФИГ.61B



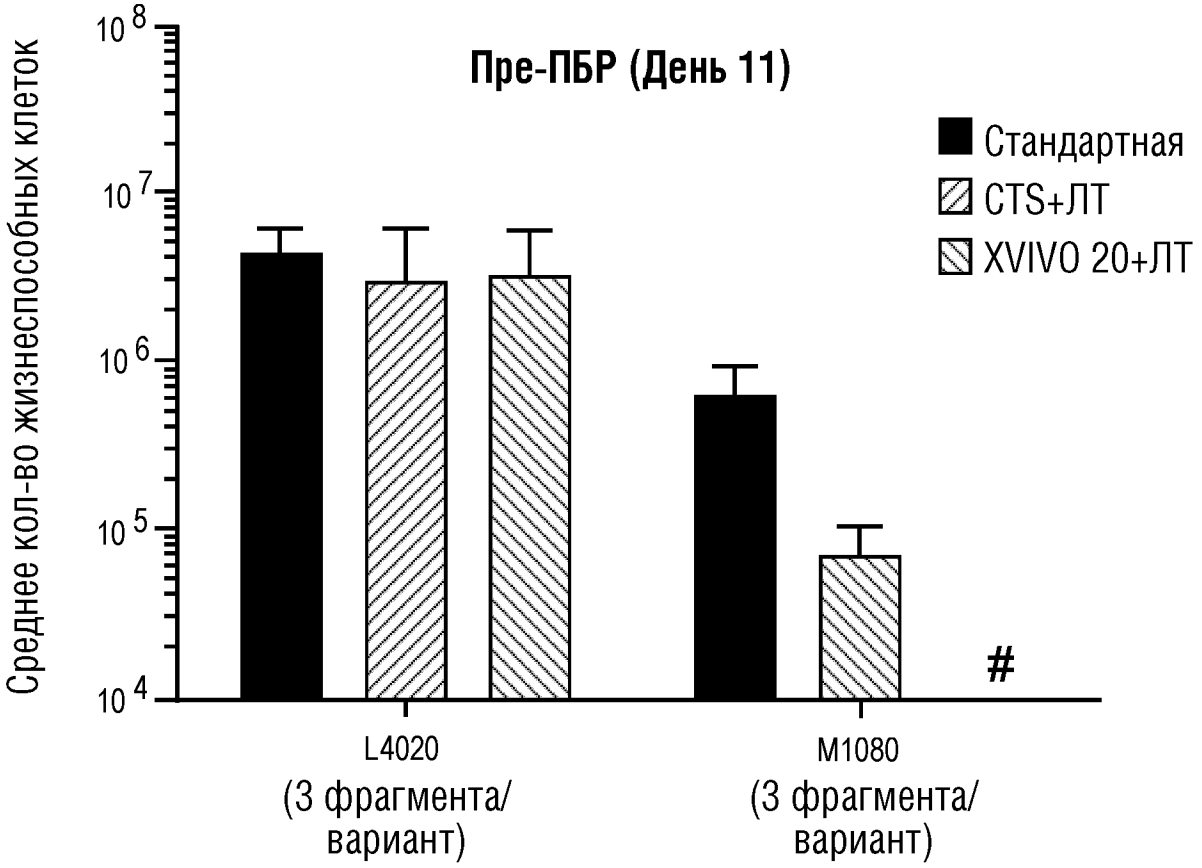
ФИГ.62A



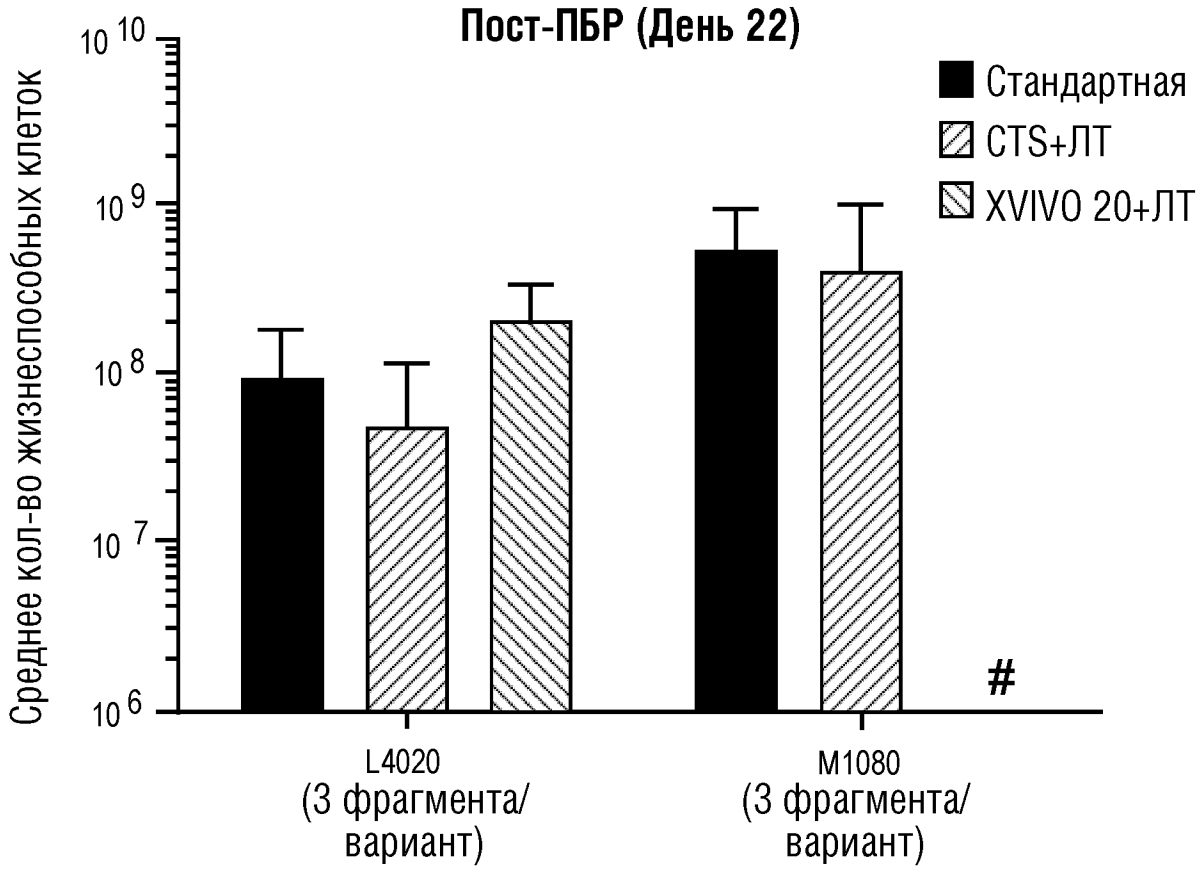
ФИГ.62B



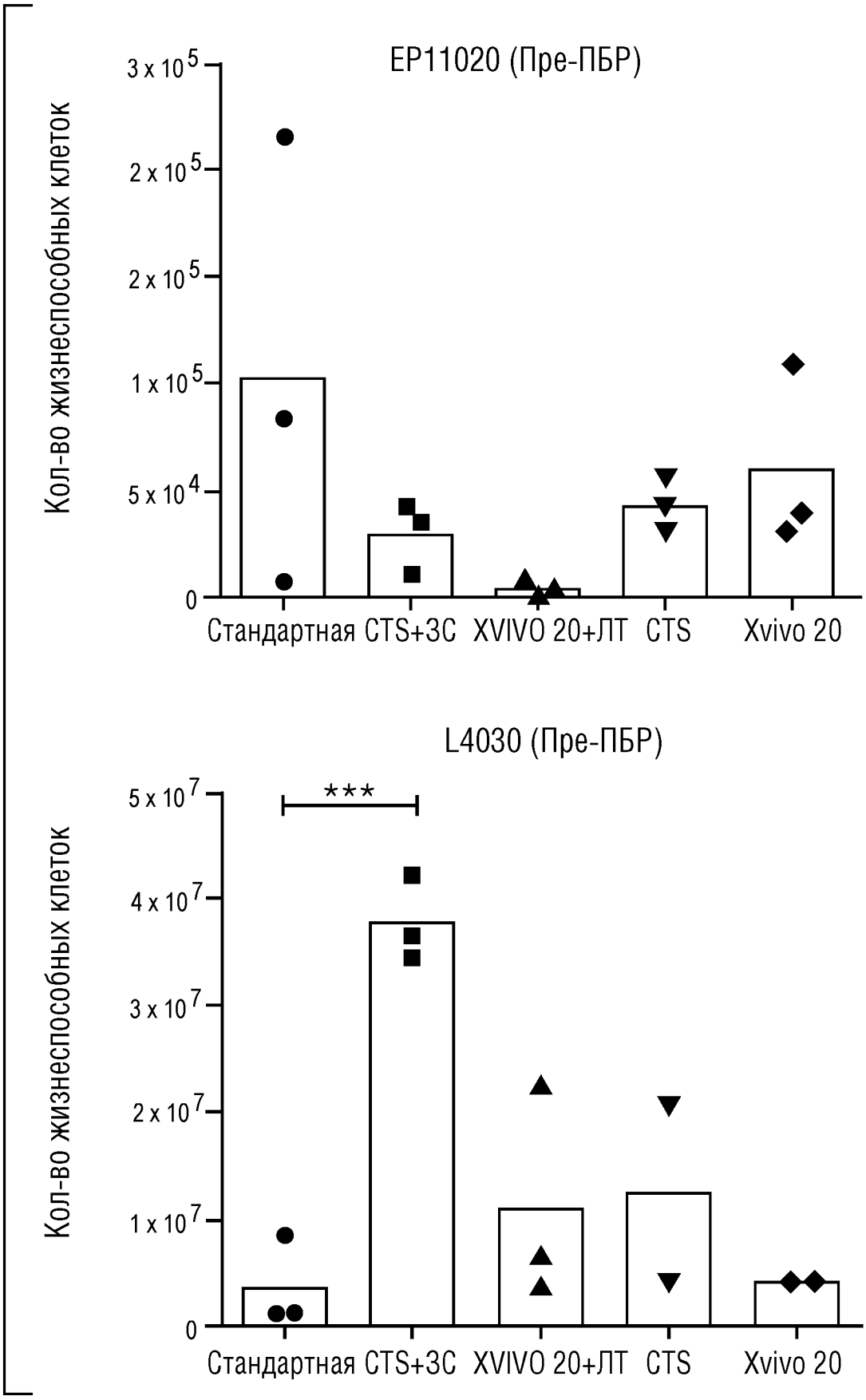
ФИГ.63A



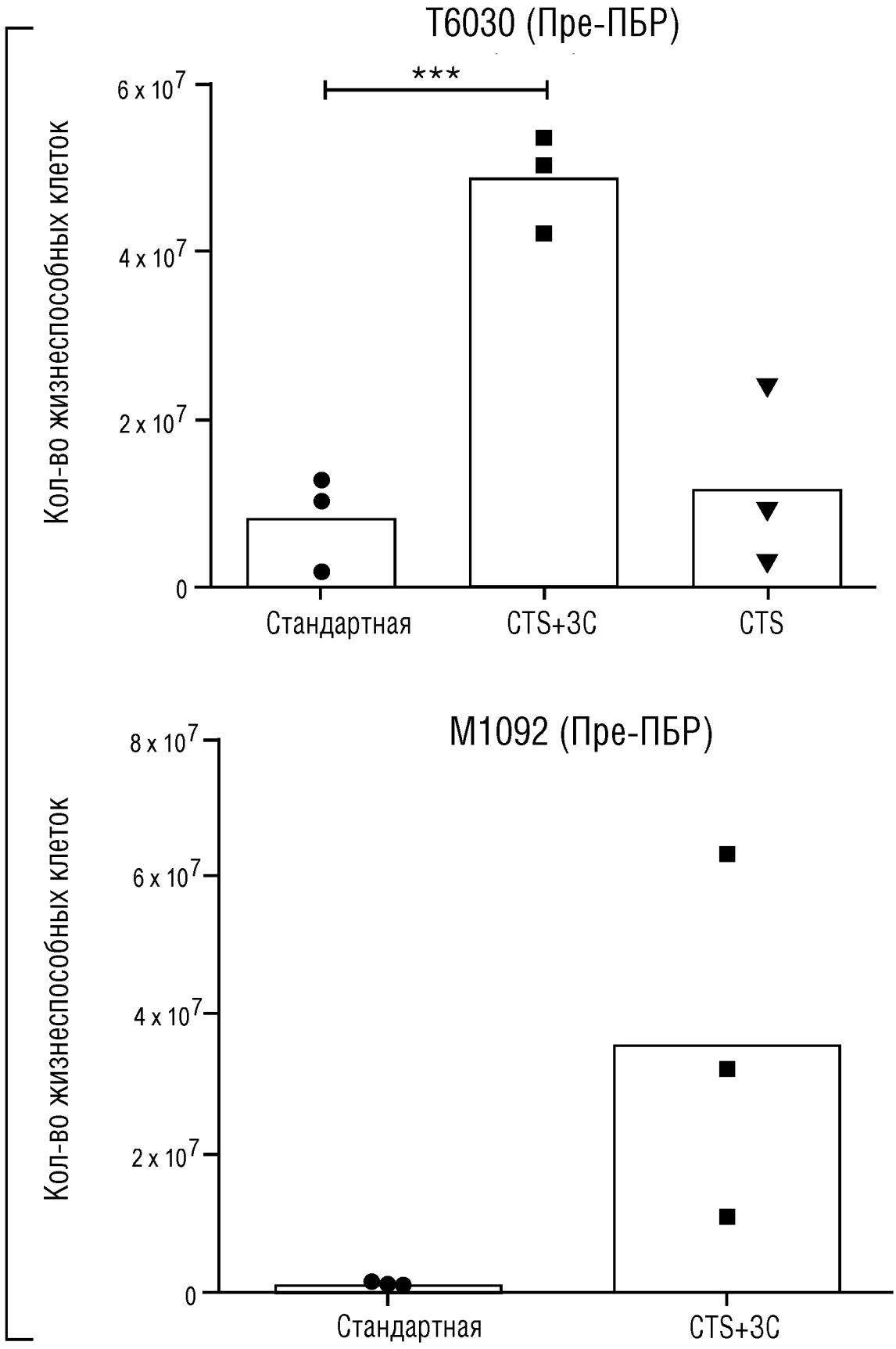
ФИГ.63B



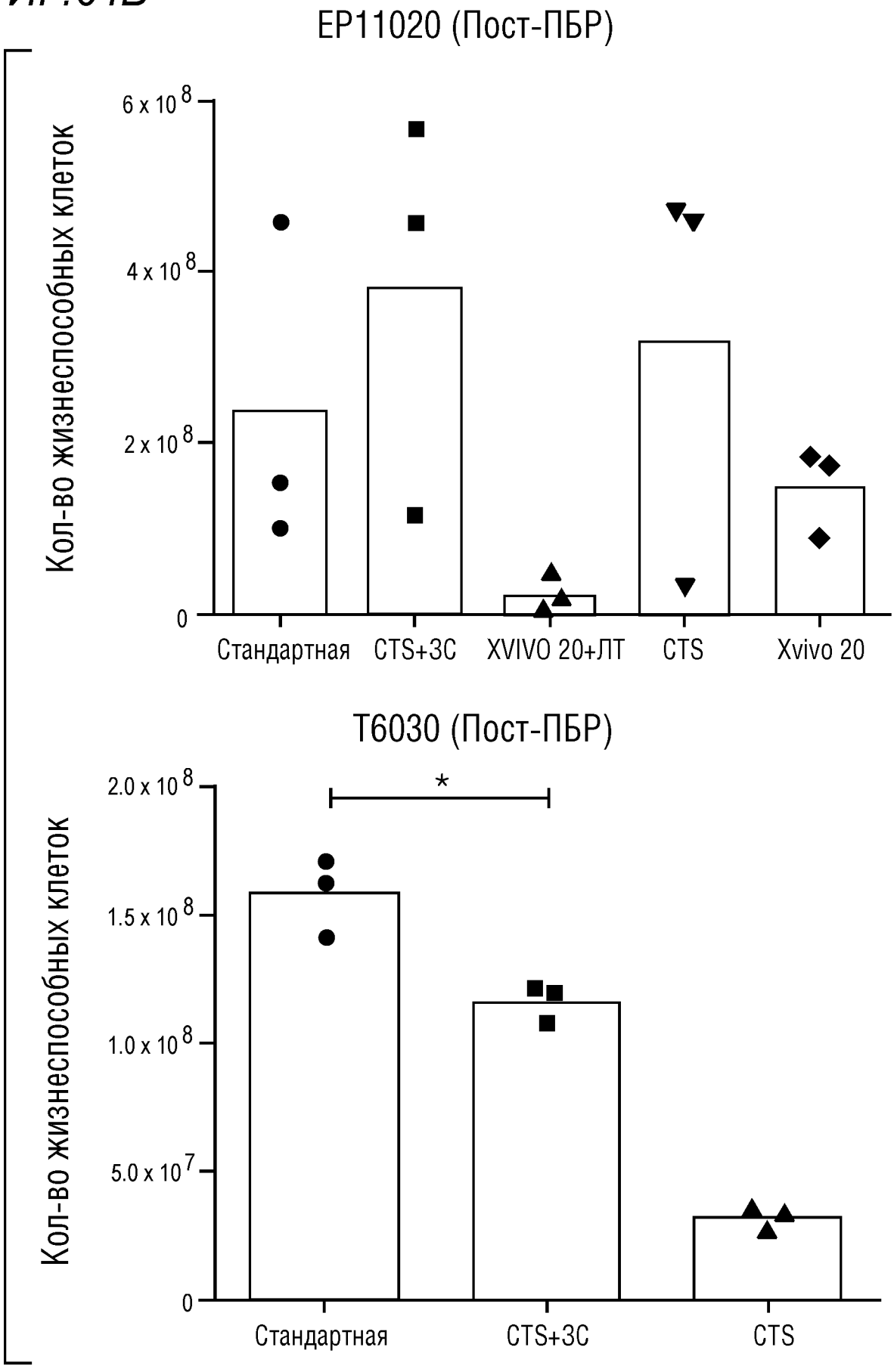
ФИГ.64А


EP11020 (Пре-ПБР)
Кол-во жизнеспособных клеток
3 x 10^5
2 x 10^5
2 x 10^5
1 x 10^5
5 x 10^4
0
Стандартная
CTS+3C
XVIVO 20+ЛТ
CTS
Xvivo 20
L4030 (Пре-ПБР)
Кол-во жизнеспособных клеток
***
5 x 10^7
4 x 10^7
3 x 10^7
2 x 10^7
1 x 10^7
0
Стандартная
CTS+3C
XVIVO 20+ЛТ
CTS
Xvivo 20

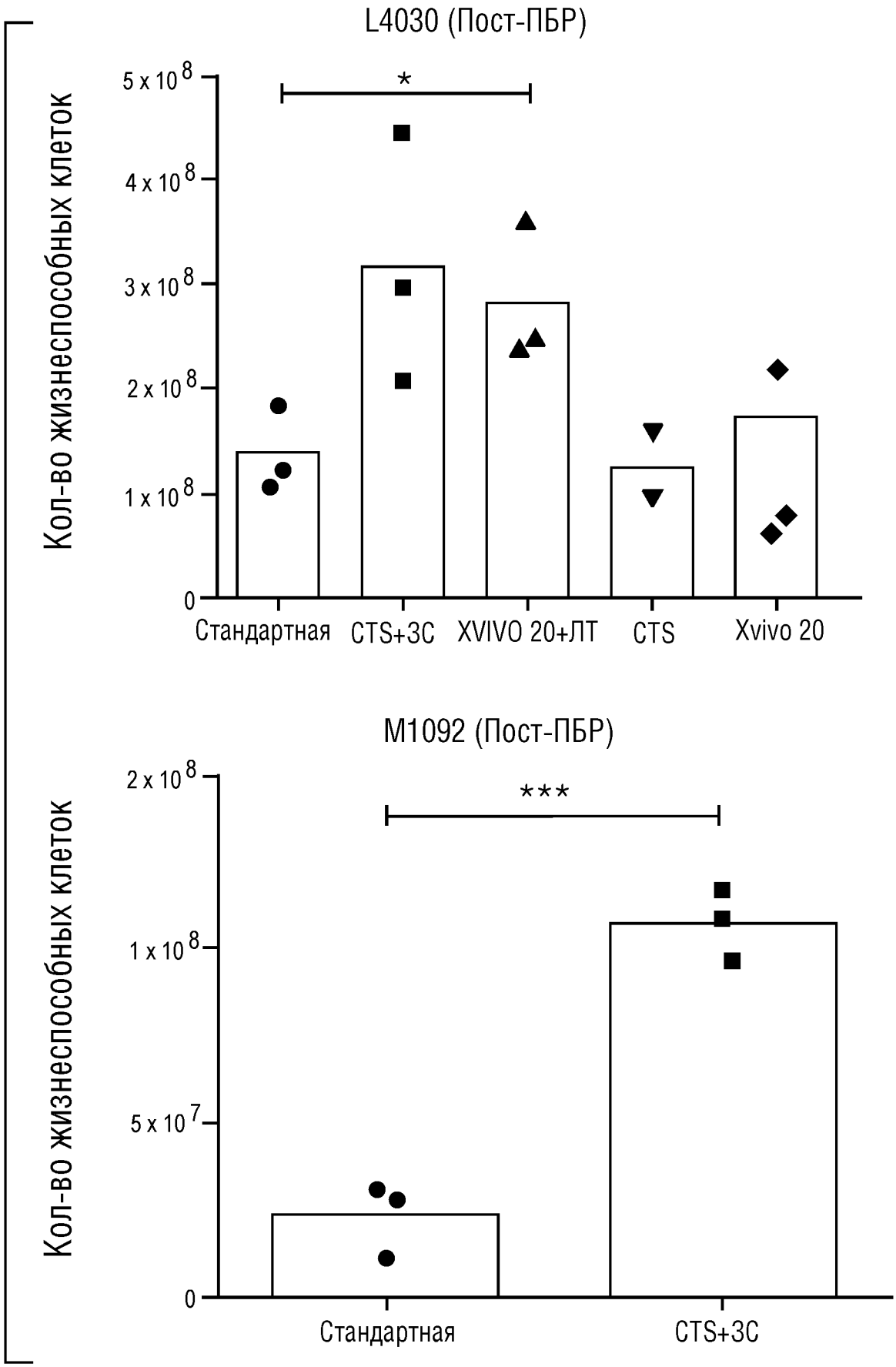
ФИГ.64А (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



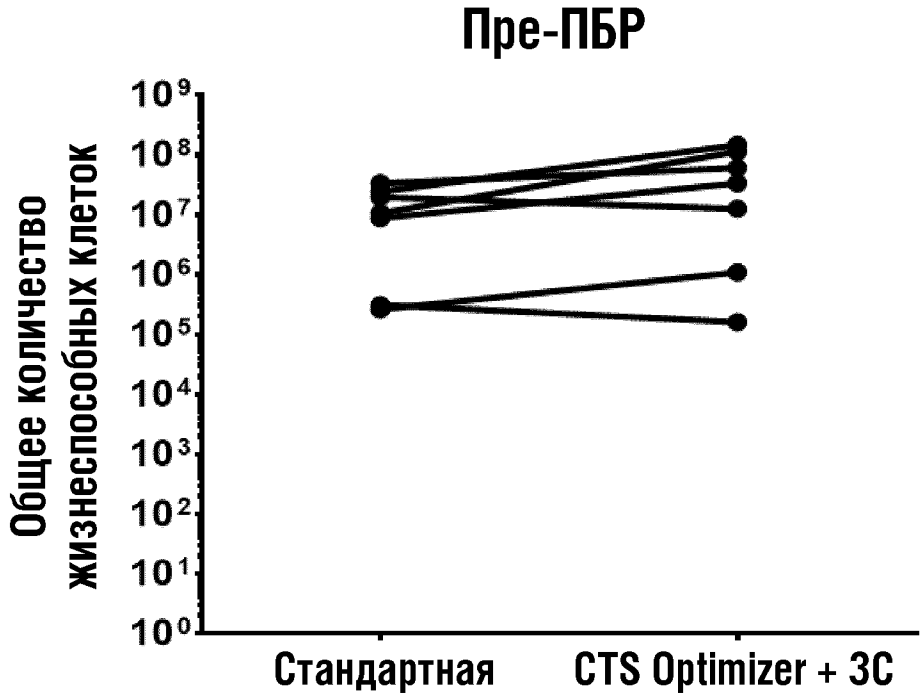
ФИГ.64B


EP11020 (Пост-ПБР)
Кол-во жизнеспособных клеток
6 x 10 8
4 x 10 8
2 x 10 8
0
Стандартная
CTS+3C
XVIVO 20+ЛТ
CTS
Xvivo 20
T6030 (Пост-ПБР)
Кол-во жизнеспособных клеток
2.0 x 10 8
1.5 x 10 8
1.0 x 10 8
5.0 x 10 7
0
*
Стандартная
CTS+3C
CTS

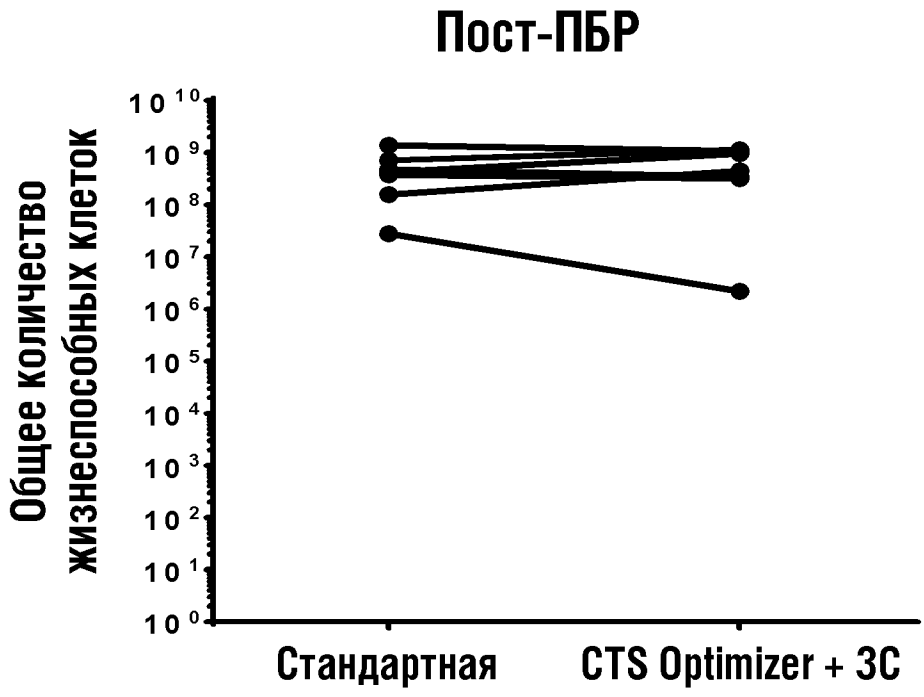
ФИГ.64В (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



ФИГ.65A



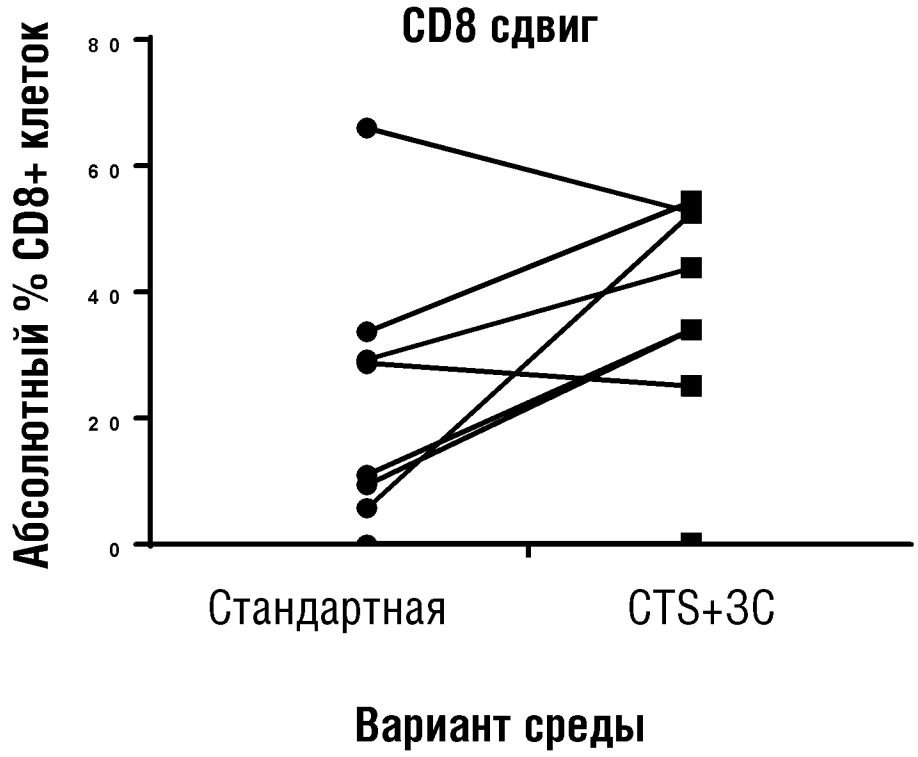
ФИГ.65B



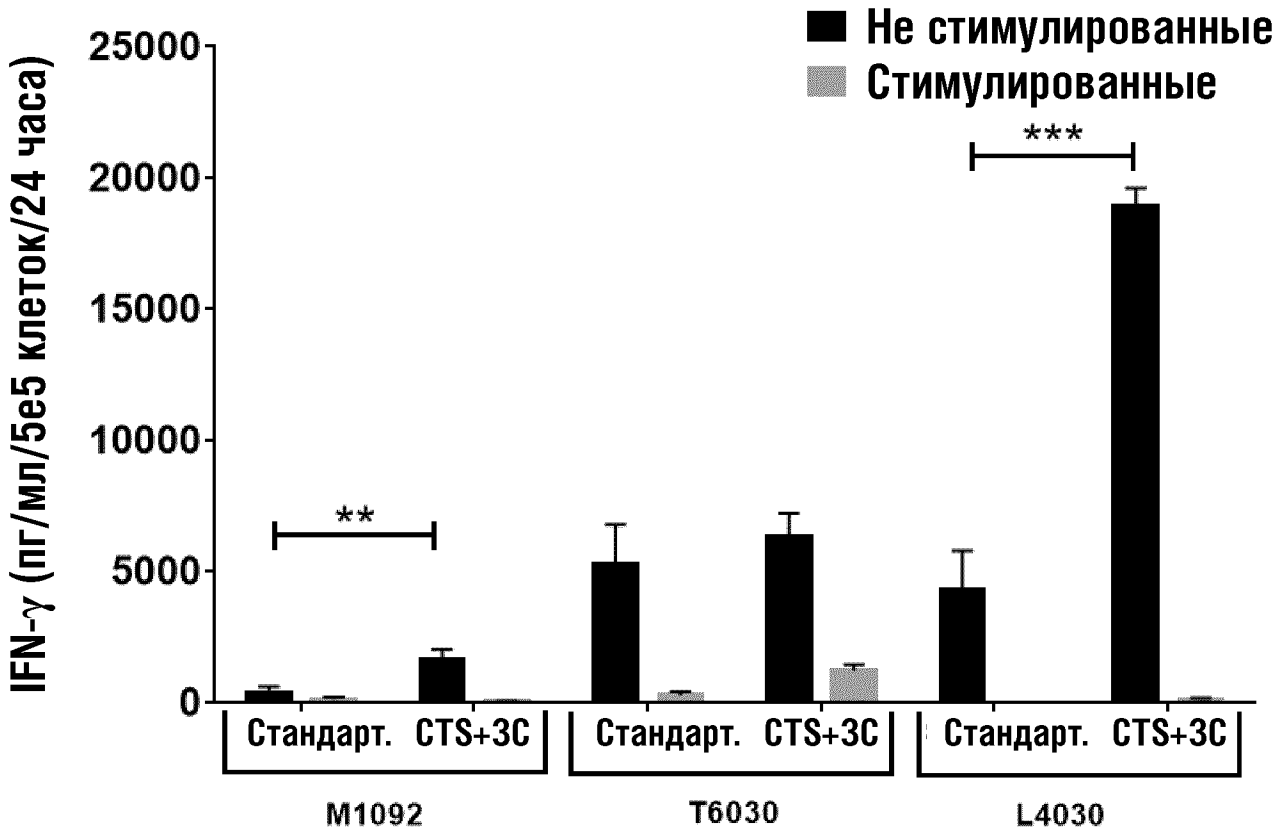
ФИГ.65С

	Количество клеток пре-ПБР		Количество клеток пост-ПБР	
	Стандартная	CTS Optimizer + 3C	Стандартная	CTS Optimizer + 3C
M1078	8.82E+07	3.38E+08	3.46E+09	2.73E+08
M1079	2.60E+06	1.09E+07	1.99E+10	5.61E+10
M1080				
L4020	1.98E+08	1.27E+08	4.75E+10	3.99E+10
L4026	1.68E+08	3.02E+08	8.63E+10	6.69E+10
L4030	7.05E+07	7.48E+08	2.63E+10	5.96E+10
EP11020	2.04E+06	1.06E+06	4.44E+10	7.14E+10
T6030	1.61E+08	9.64E+08	2.98E+10	2.18E+10
M1092	2.00E+07	7.05E+08	4.41E+09	2.02E+10

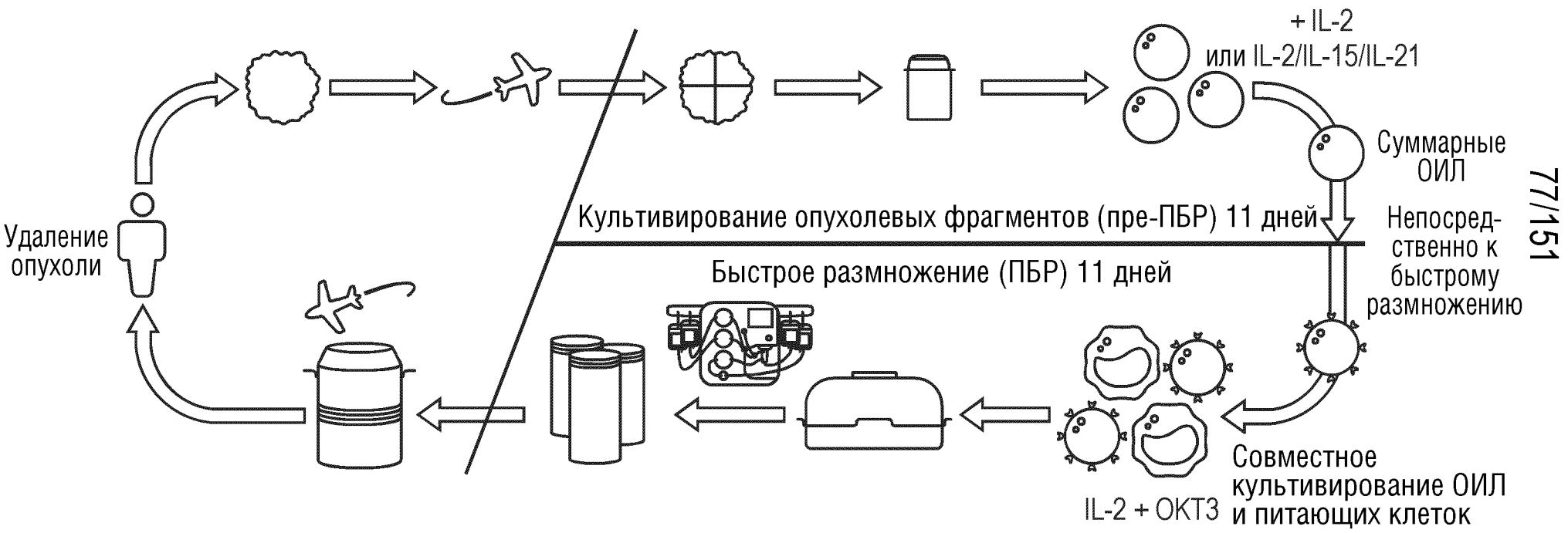
ФИГ.66


CD8 сдвиг
Абсолютный % CD8+ клеток
80
60
40
20
0
Стандартная
CTS+3C
Вариант среды

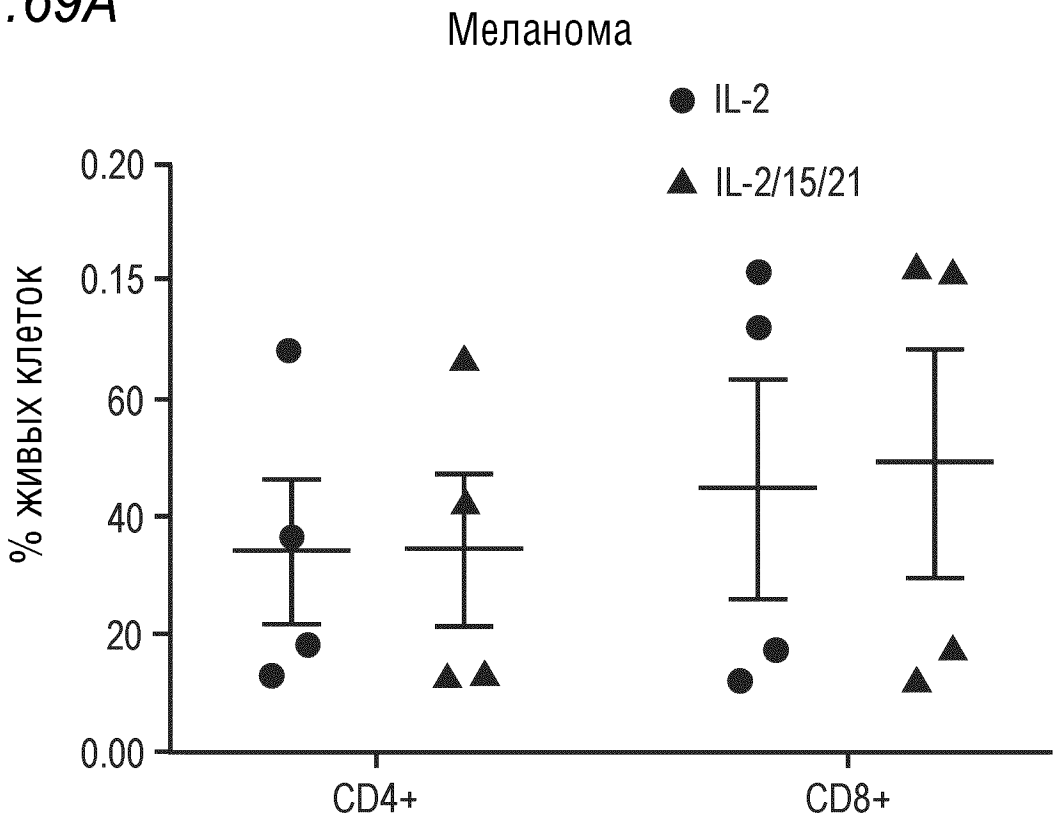
ФИГ.67


Не стимулированные
Стимулированные
IFN-γ (пг/мл/5e5 клеток/24 часа)
25000
20000
15000
10000
5000
0
**
***
Стандарт.
CTS+3C
Стандарт.
CTS+3C
Стандарт.
CTS+3C
M1092
T6030
L4030

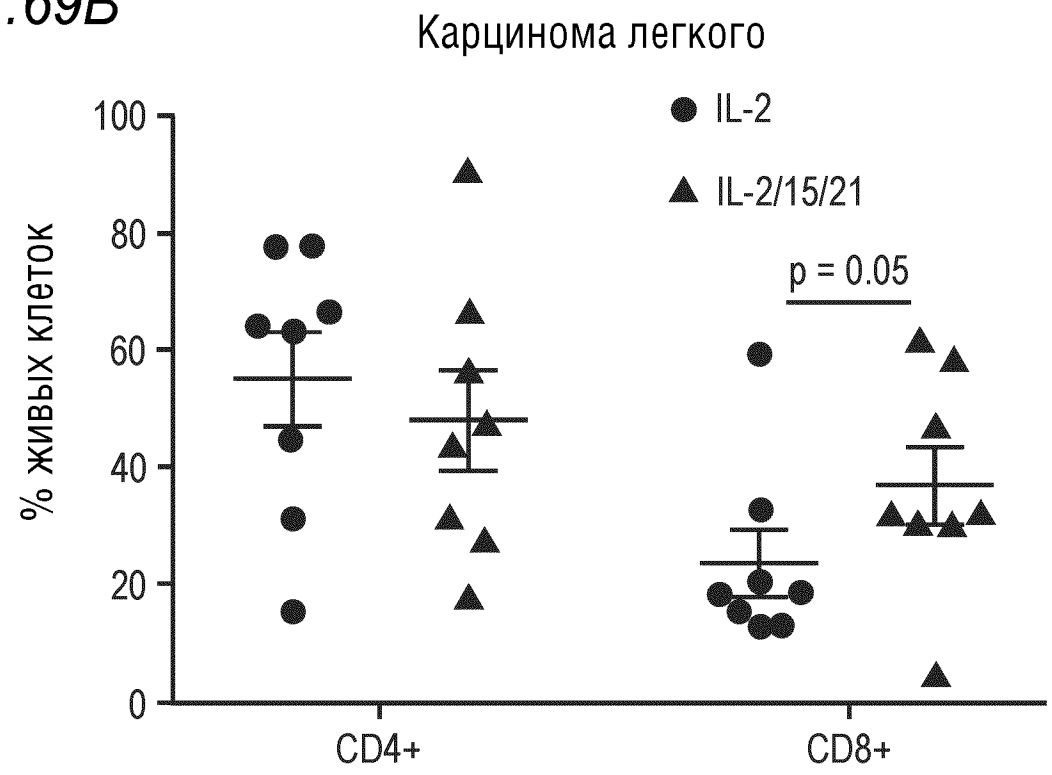
ФИГ.68


+ IL-2
или IL-2/IL-15/IL-21
Суммарные ОИЛ
Удаление опухоли
Культивирование опухолевых фрагментов (пре-ПБР) 11 дней
Непосред-ственно к быстрому размножению
Быстрое размножение (ПБР) 11 дней
Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток
IL-2 + OKT3

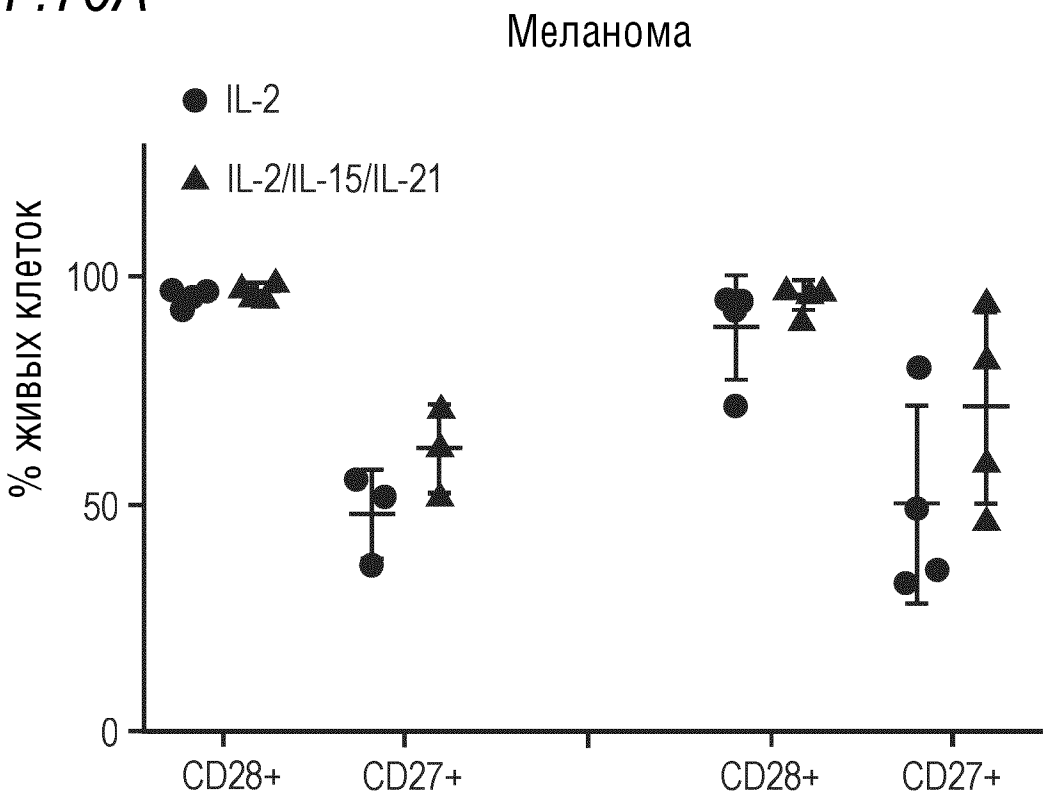
ФИГ.69A



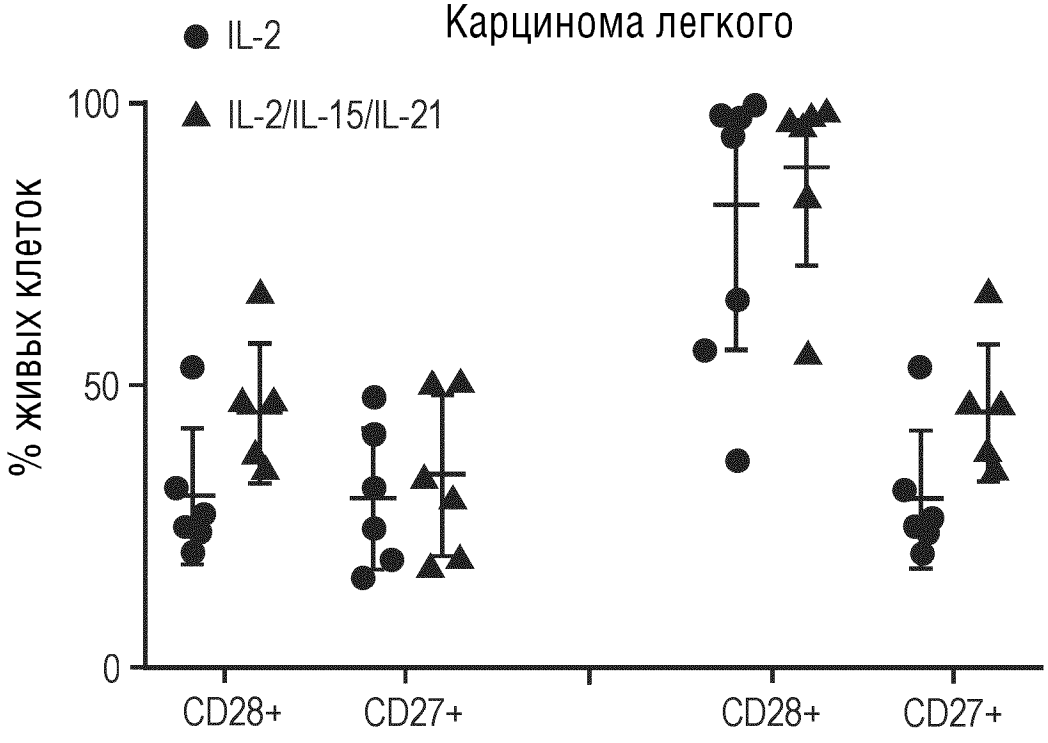
ФИГ.69B



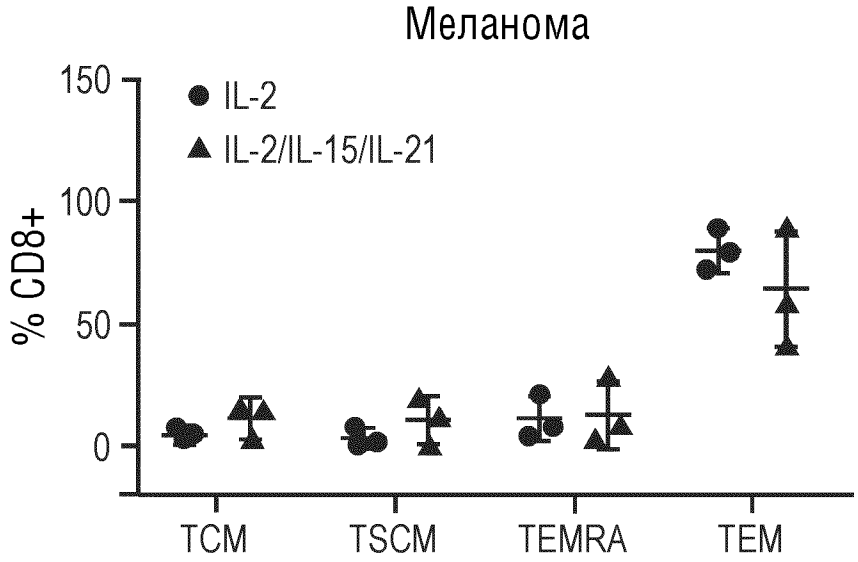
ФИГ.70A



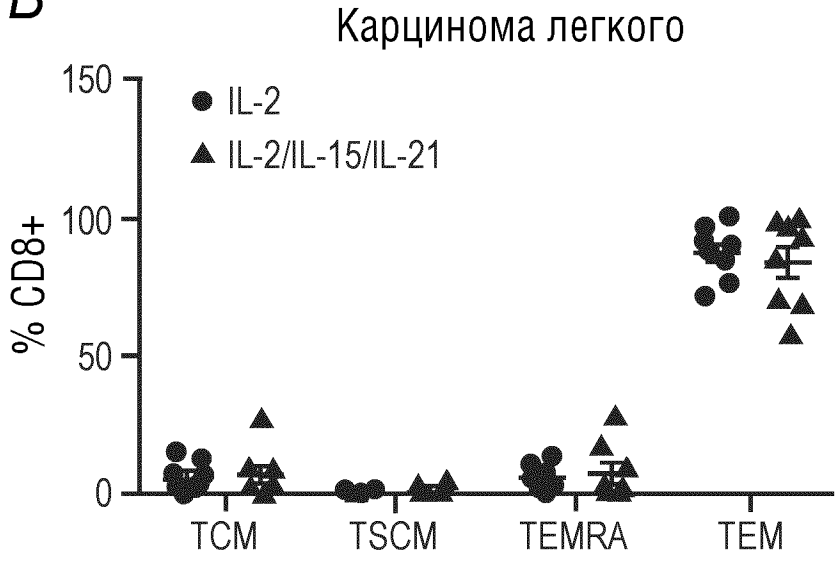
ФИГ.70B



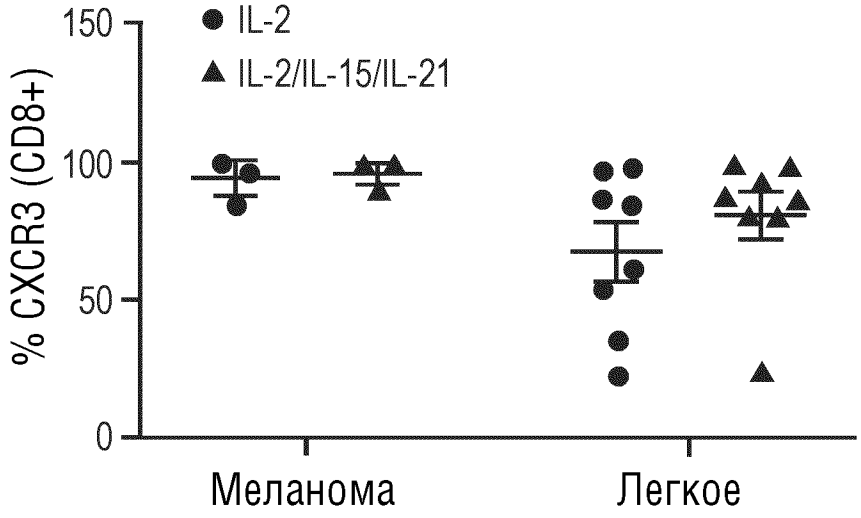
ФИГ.71A



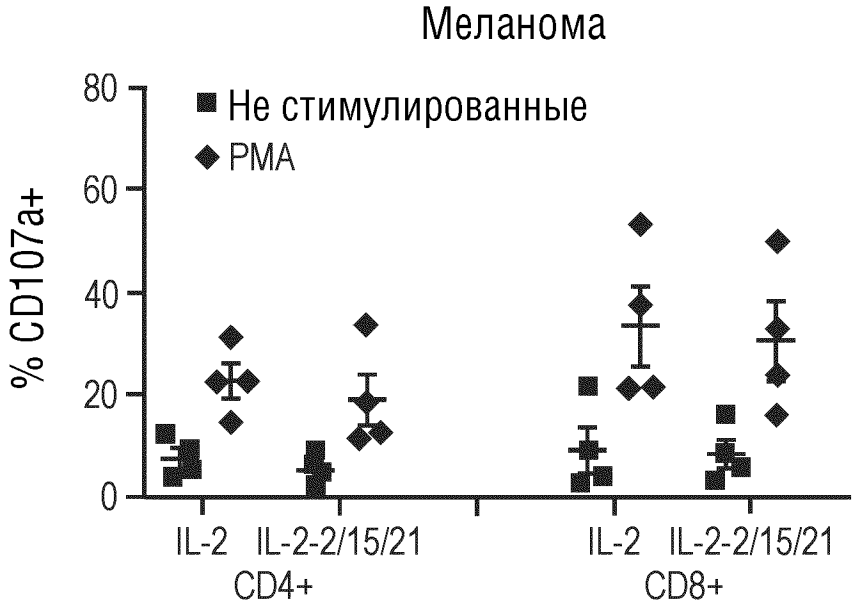
ФИГ.71B



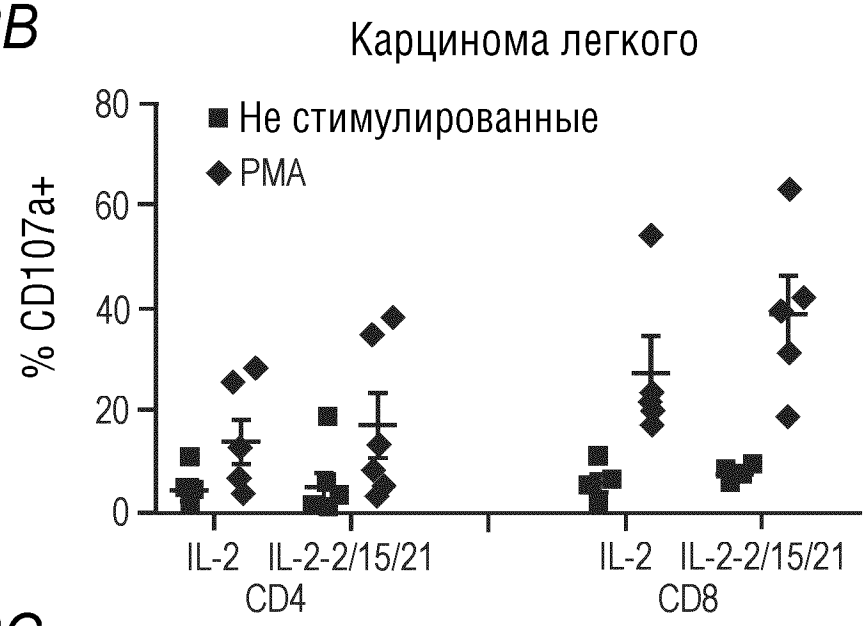
ФИГ.71C



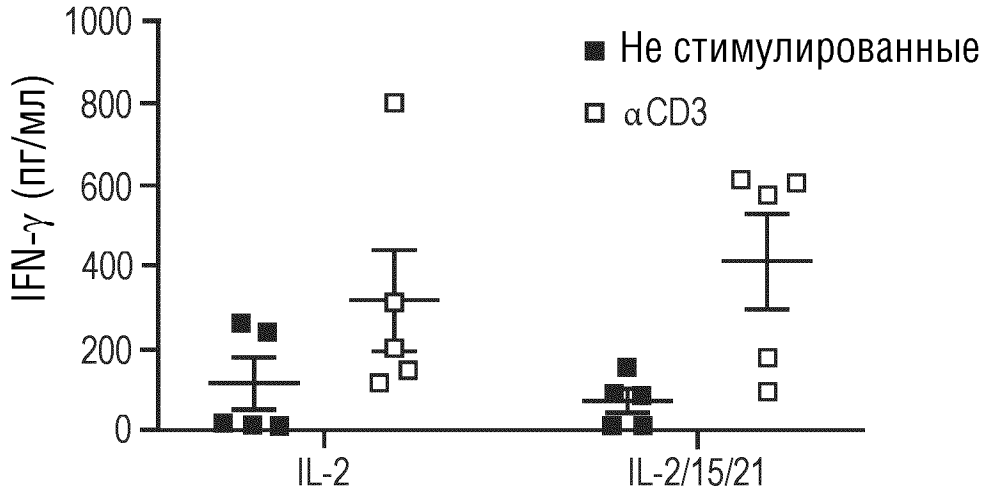
ФИГ.72A



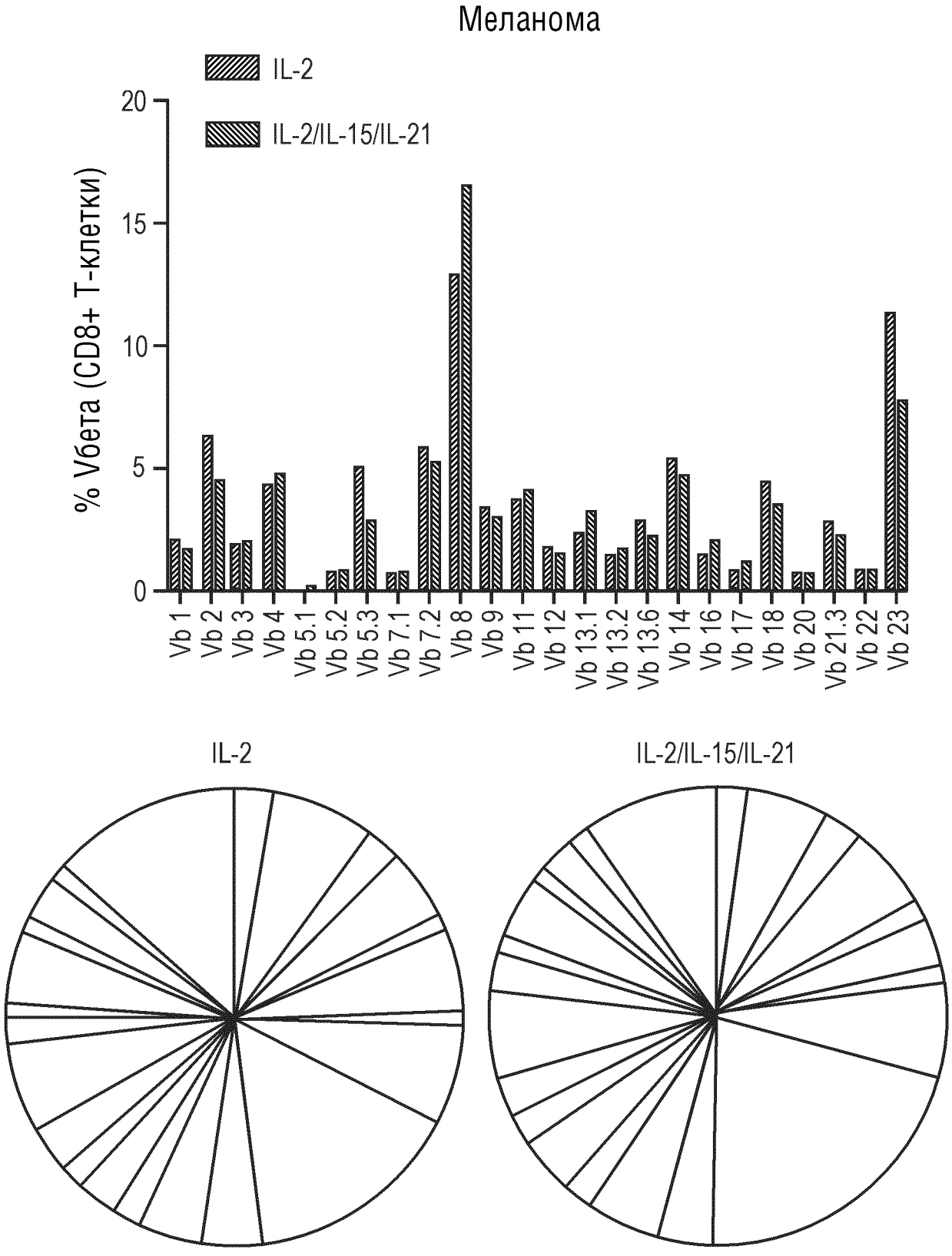
ФИГ.72B



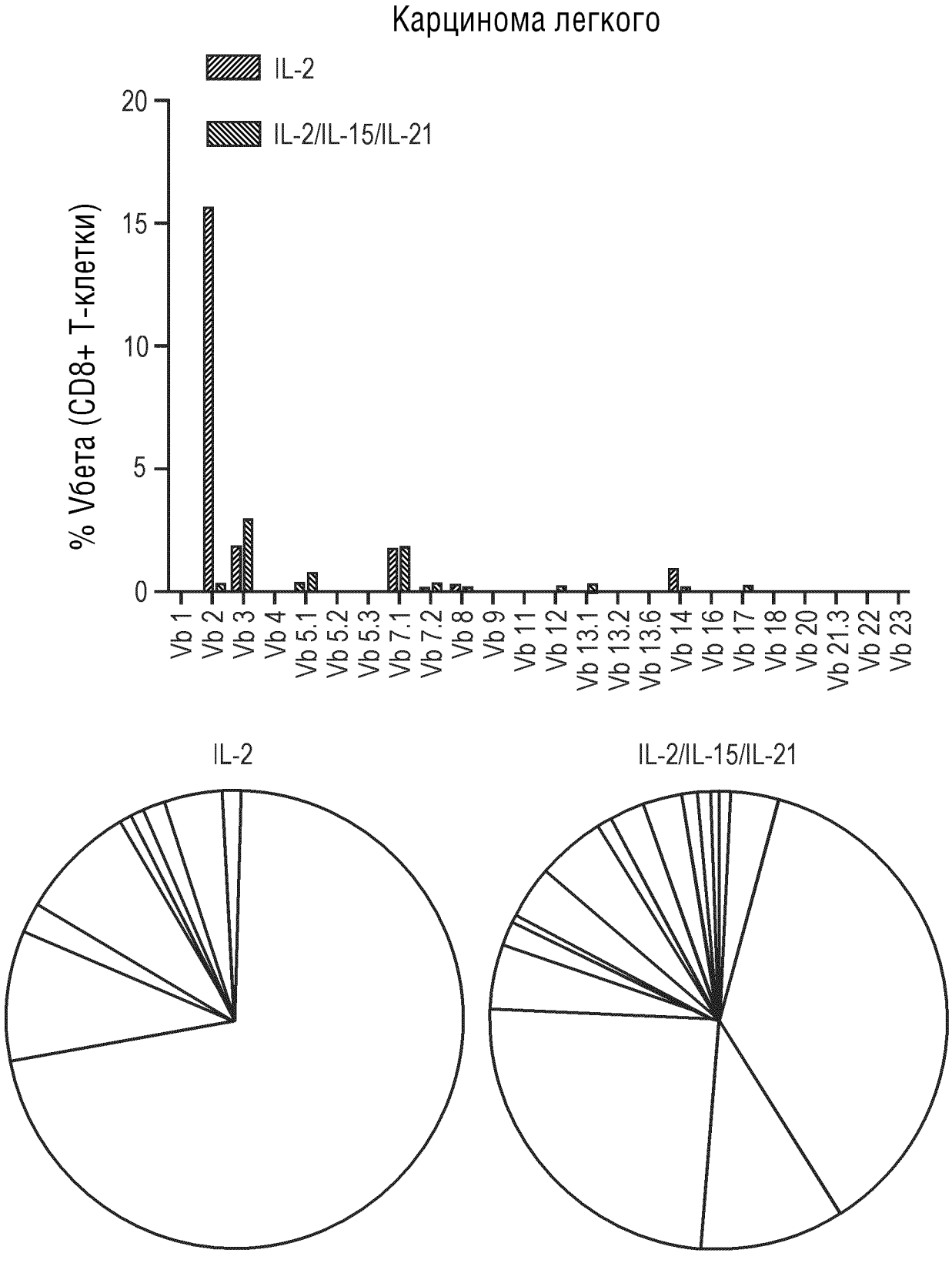
ФИГ.72C



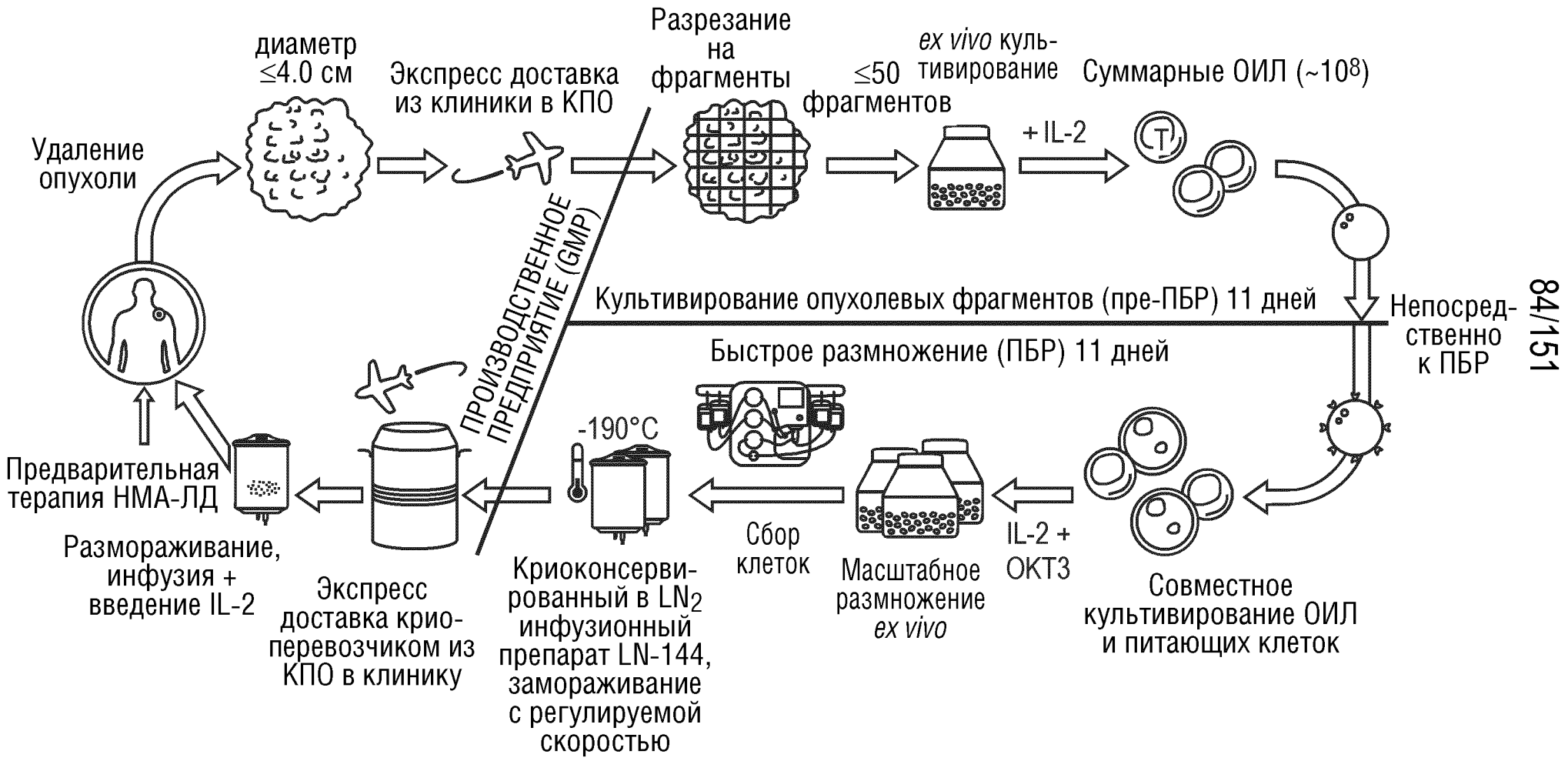
ФИГ.73А


Меланома
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% Vбета (CD8+ Т-клетки)
20
15
10
5
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21

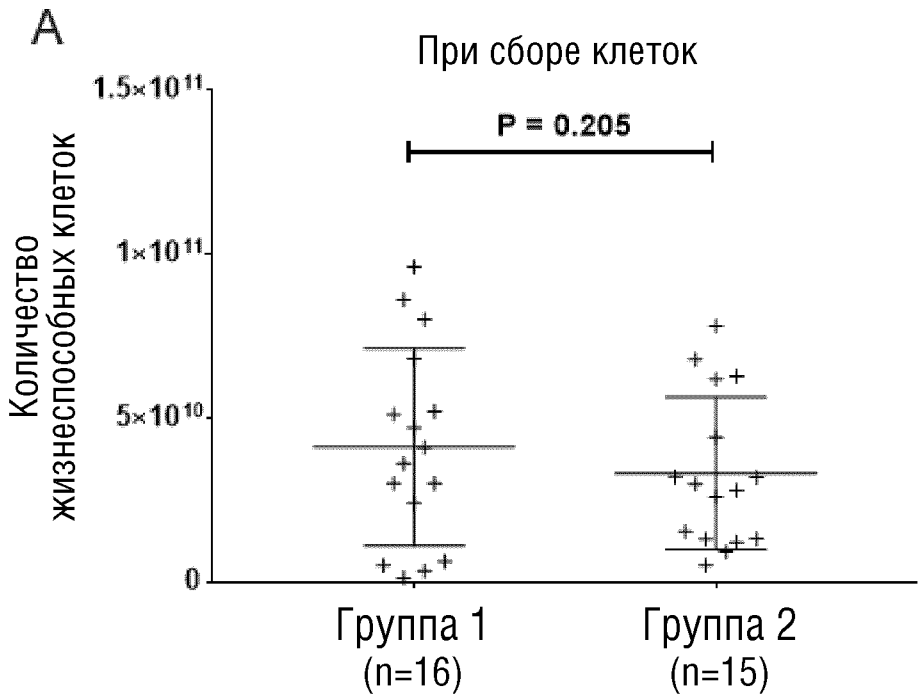
ФИГ.73B


Карцинома легкого
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% Vбета (CD8+ Т-клетки)
20
15
10
5
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21

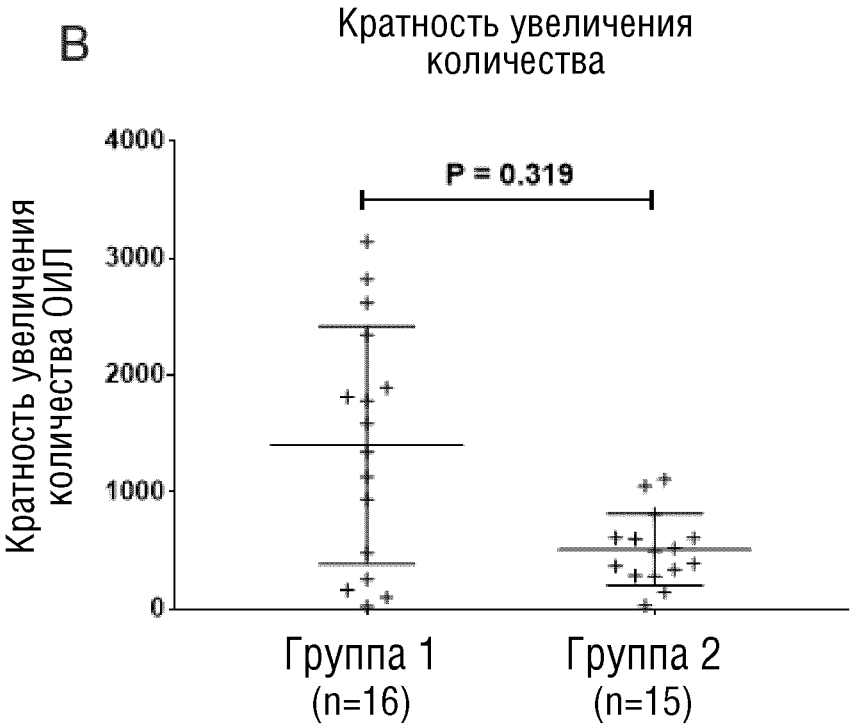
ФИГ.74


диаметр ≤4.0 см
Экспресс доставка из клиники в КПО
Разрезание на фрагменты
≤50 фрагментов
ex vivo культивирование
Суммарные ОИЛ (~10^8)
+ IL-2
Удаление опухоли
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ (GMP)
Культивирование опухолевых фрагментов (пре-ПБР) 11 дней
Непосредственно к ПБР
Быстрое размножение (ПБР) 11 дней
Предварительная терапия НМА-ЛД
Размораживание, инфузия + введение IL-2
Экспресс доставка криоперевозчиком из КПО в клинику
-190°C
Криоконсервированный в LN_2 инфузионный препарат LN-144, замораживание с регулируемой скоростью
Сбор клеток
Масштабное размножение *ex vivo*
IL-2 + OKT3
Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток

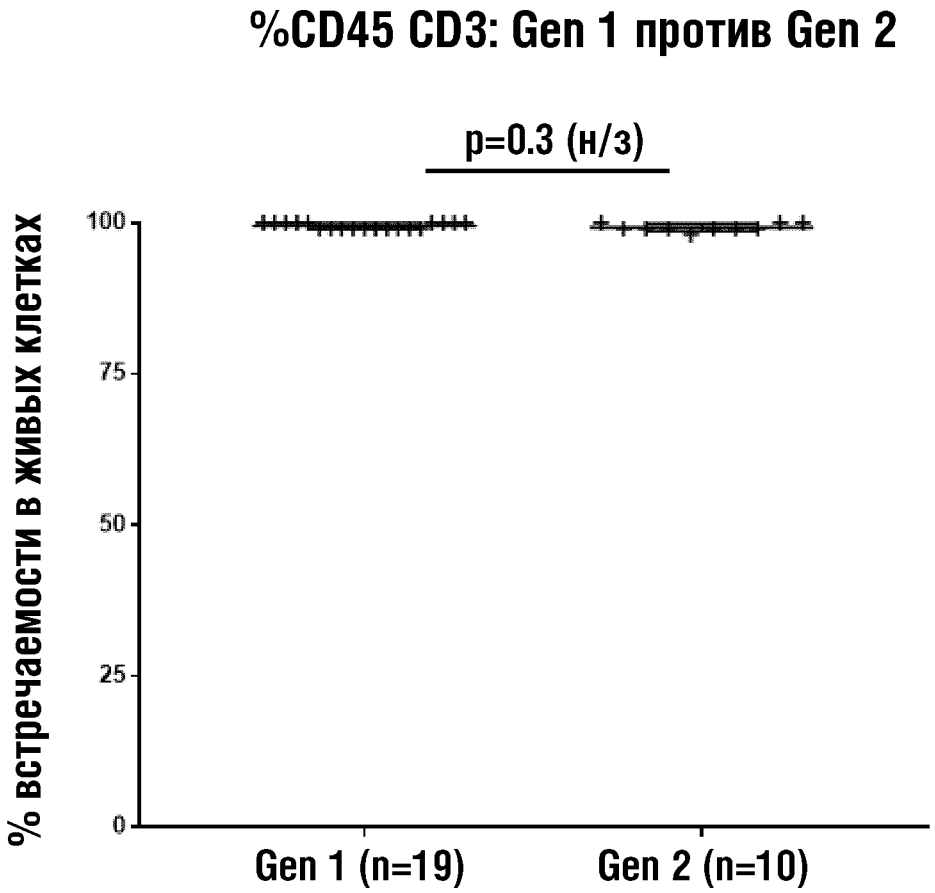
ФИГ.75A



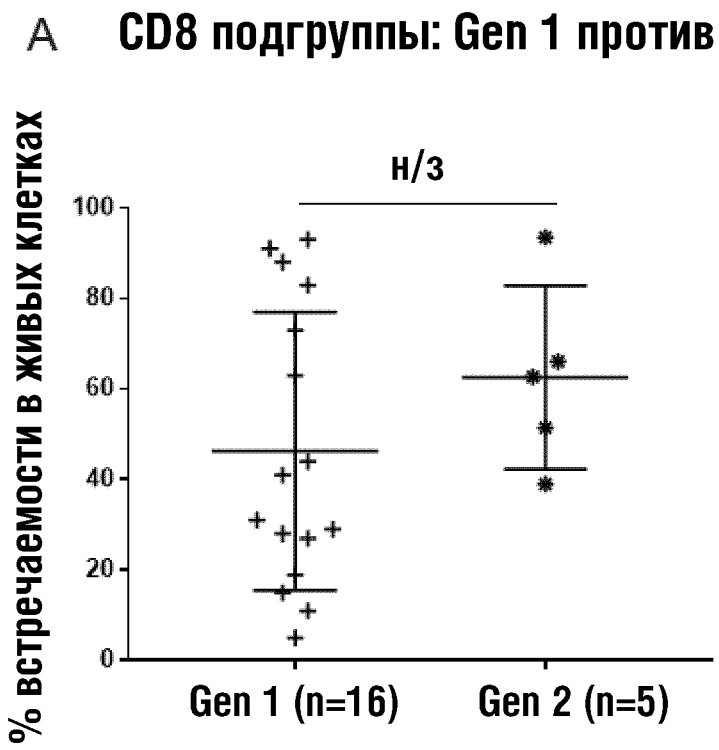
ФИГ.75B



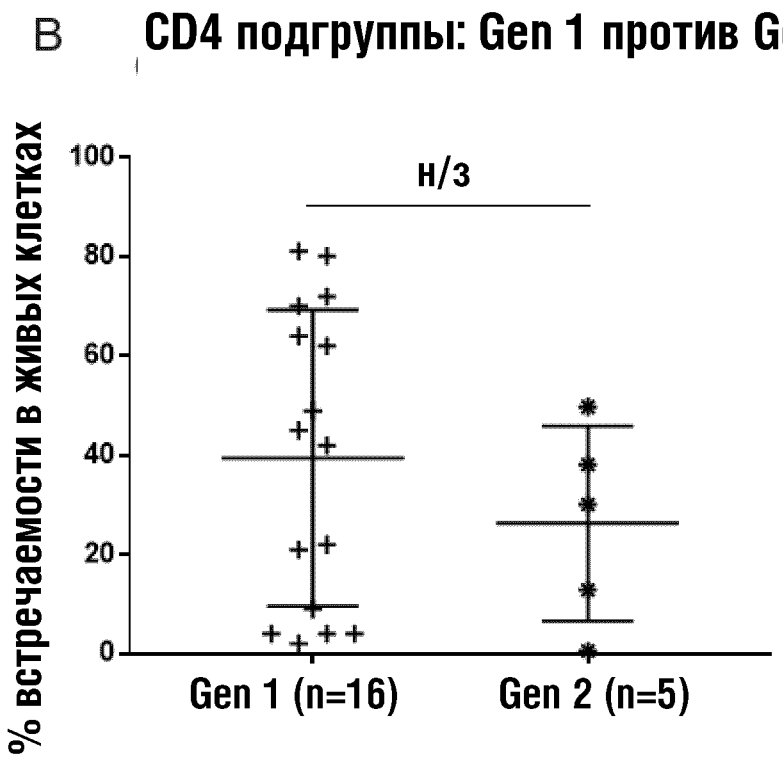
ФИГ.76


%CD45 CD3: Gen 1 против Gen 2
p=0.3 (н/з)
% встречаемости в живых клетках
100
75
50
25
0
Gen 1 (n=19)
Gen 2 (n=10)

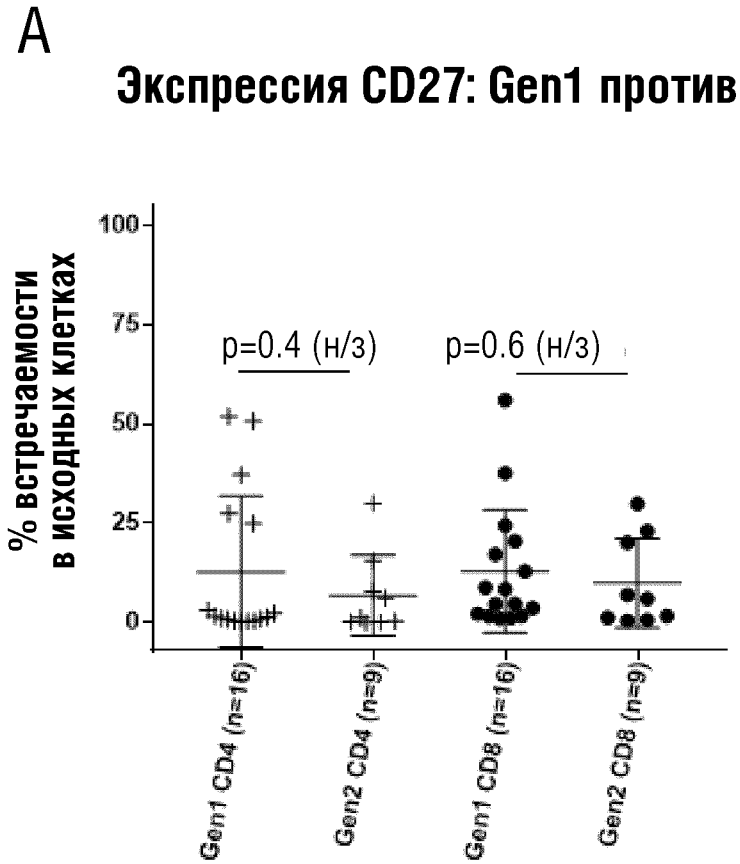
ФИГ.77A



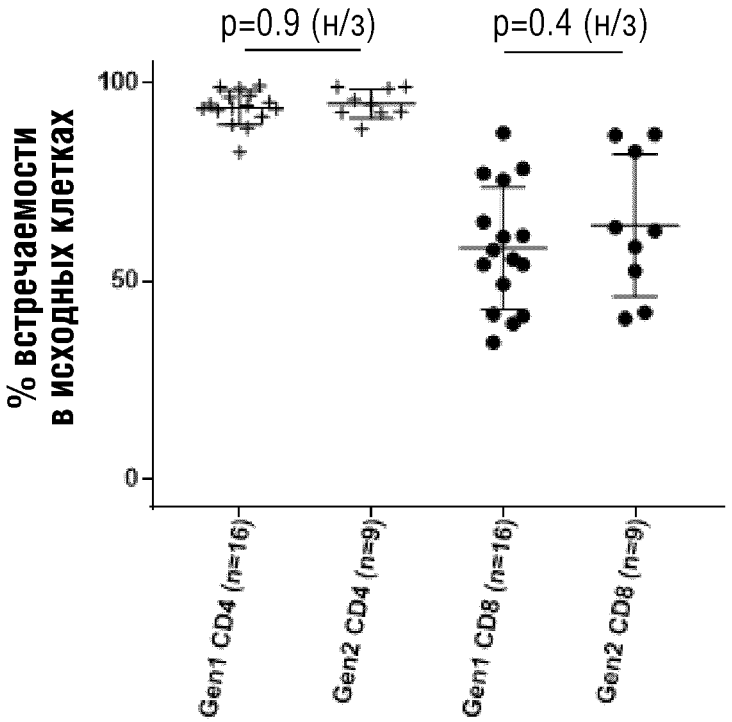
ФИГ.77B



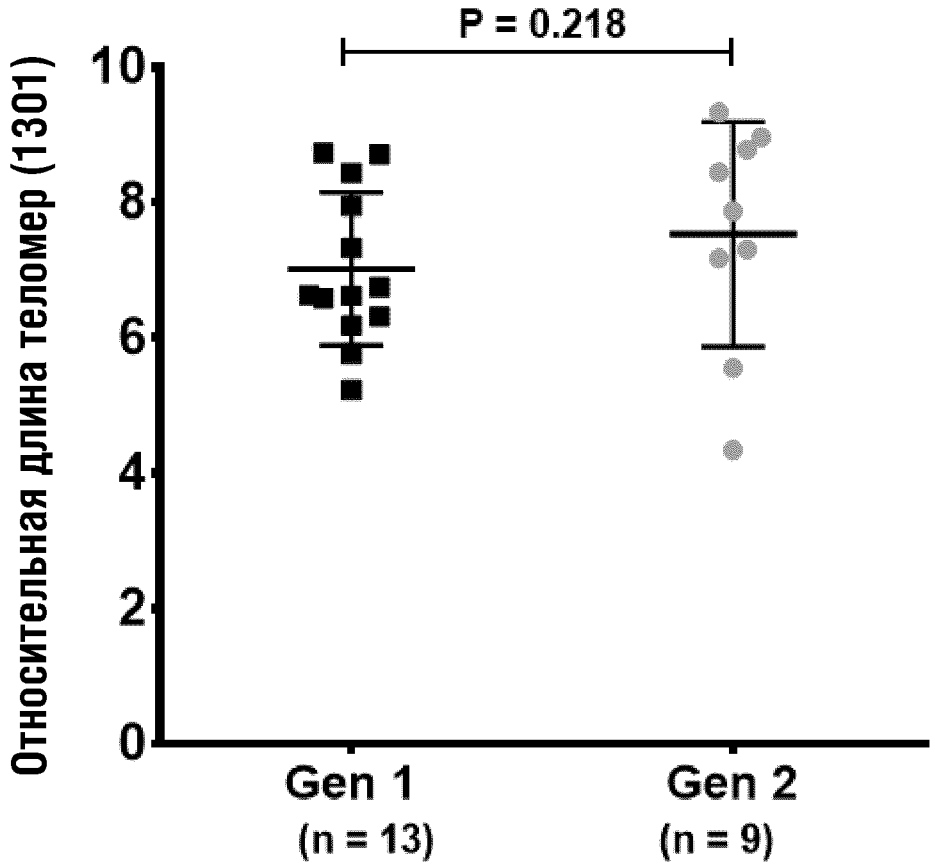
ФИГ.78A



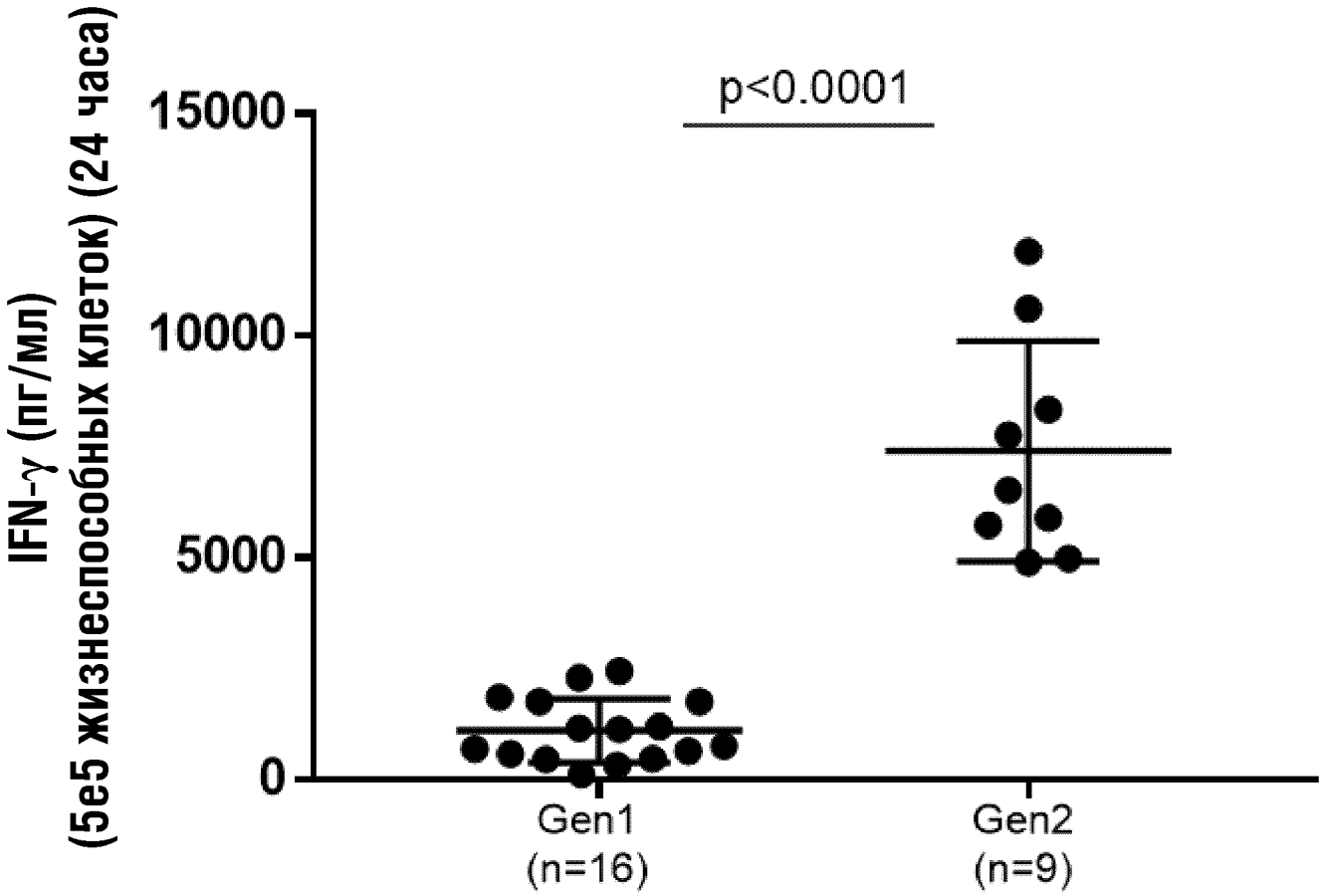
ФИГ.78B



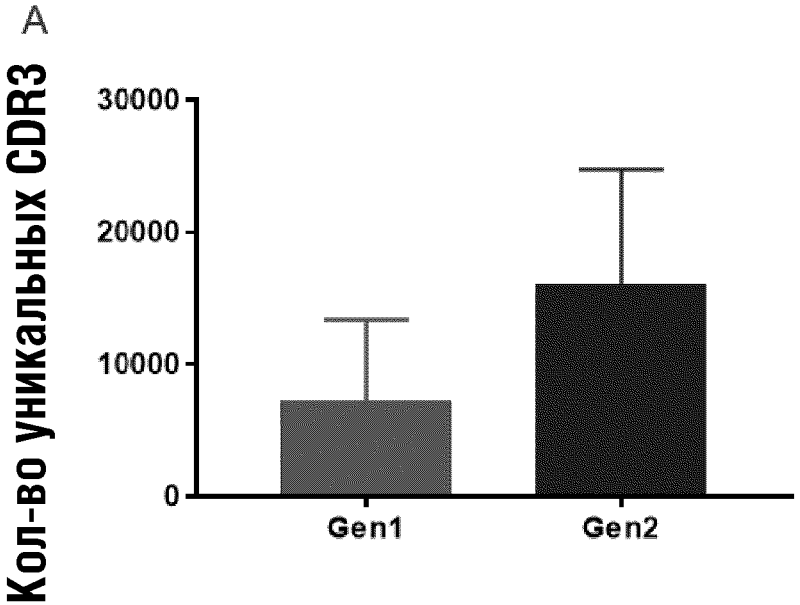
ФИГ.79


P = 0.218
Относительная длина теломер (1301)
10
8
6
4
2
0
Gen 1
(n = 13)
Gen 2
(n = 9)

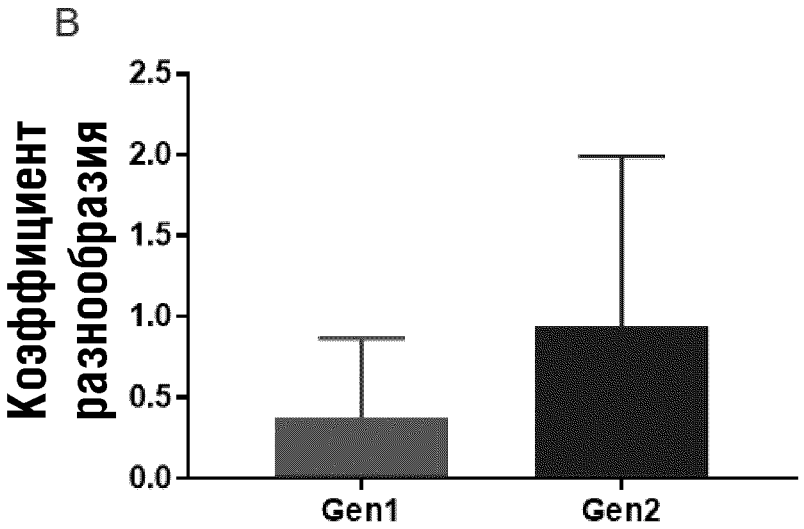
ФИГ.80


IFN-γ (пг/мл)
(5e5 жизнеспособных клеток) (24 часа)
15000
10000
5000
0
p<0.0001
Gen1
(n=16)
Gen2
(n=9)

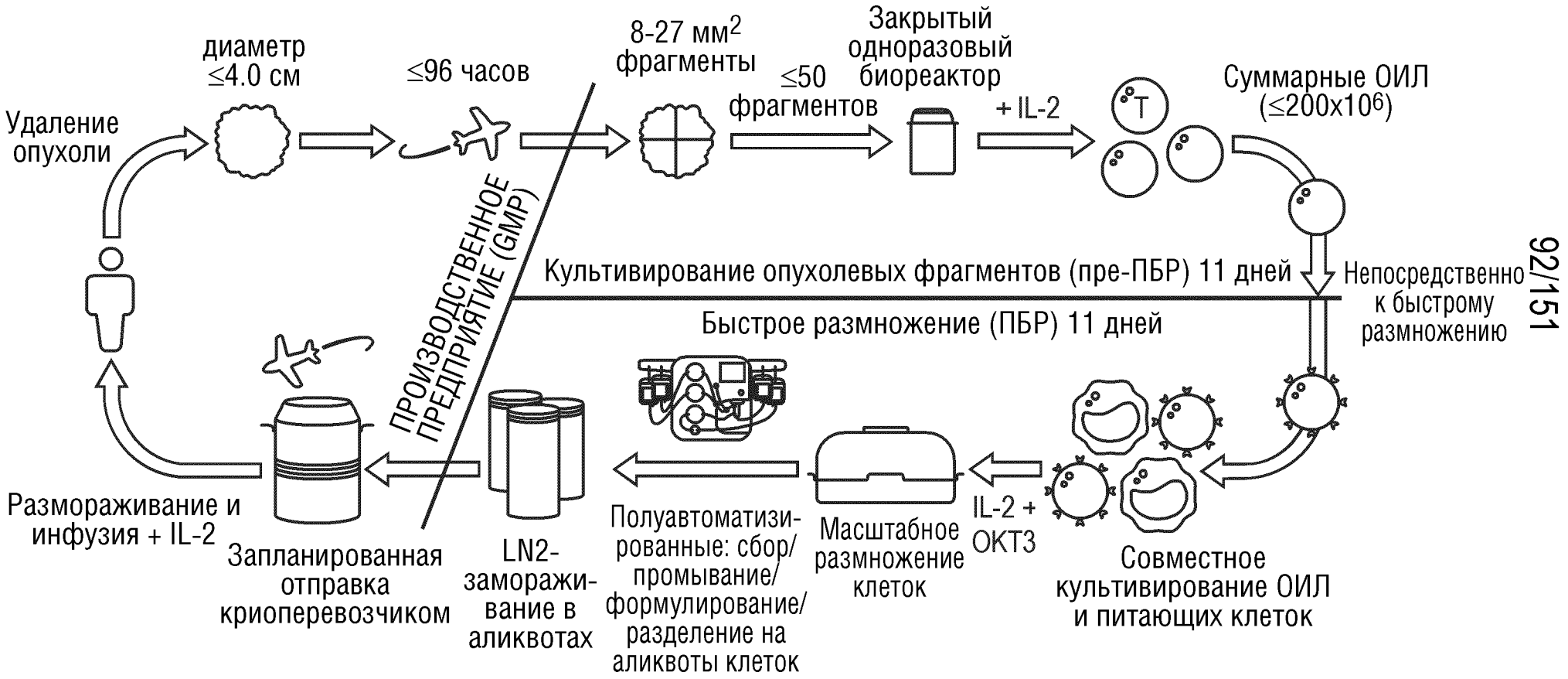
ФИГ.81A



ФИГ.81B



ФИГ.82


Удаление опухоли
диаметр ≤4.0 см
≤96 часов
8-27 мм2 фрагменты
≤50 фрагментов
Закрытый одноразовый биореактор
+ IL-2
Суммарные ОИЛ (≤200x10^6)
Культивирование опухолевых фрагментов (пре-ПБР) 11 дней
Непосредственно к быстрому размножению
Быстрое размножение (ПБР) 11 дней
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ (GMP)
Размораживание и инфузия + IL-2
Запланированная отправка криоперевозчиком
LN2-замораживание в аликвотах
Полуавтоматизированные: сбор/промывание/формулирование/разделение на аликвоты клеток
Масштабное размножение клеток
IL-2 + OKT3
Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток

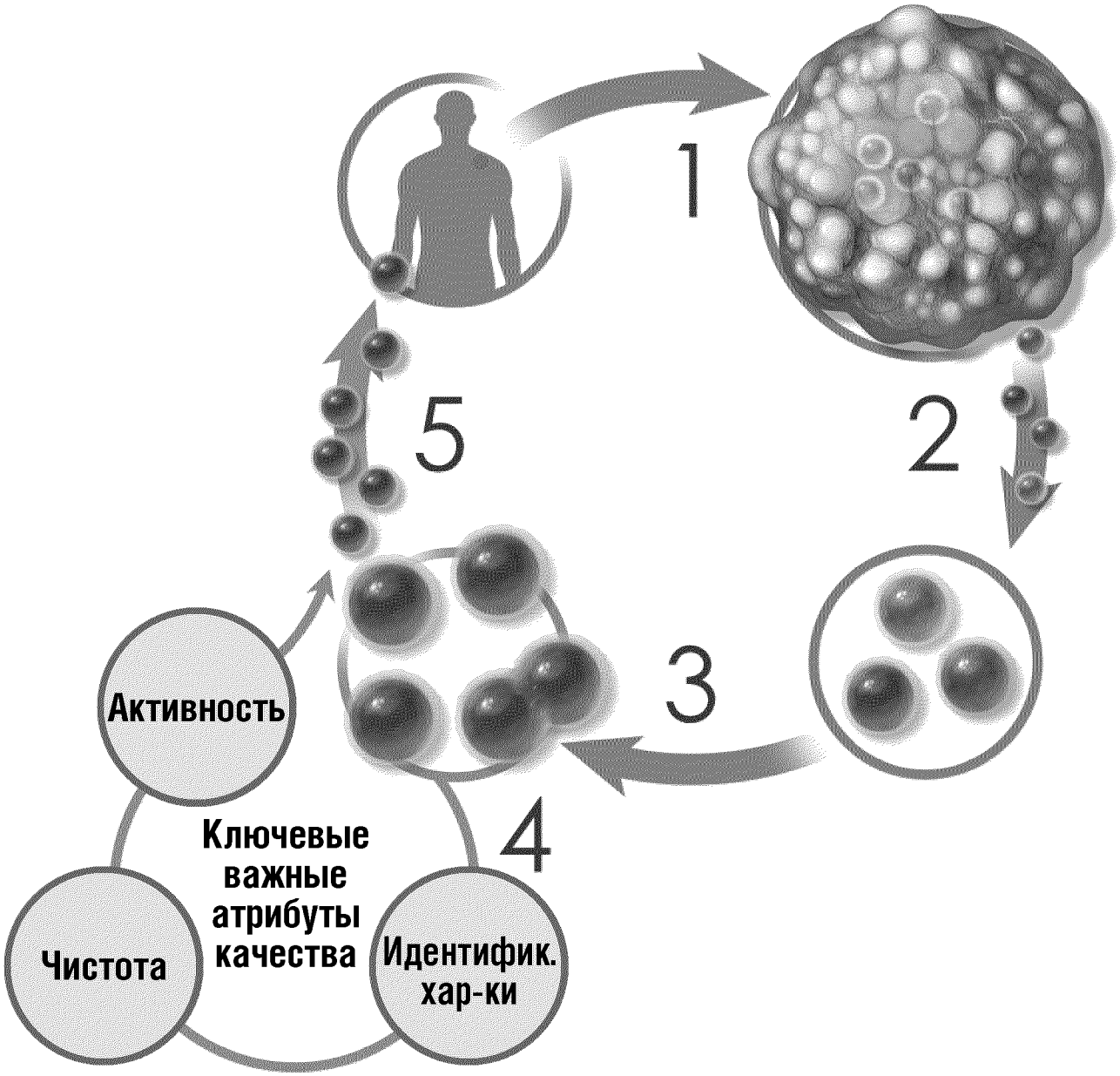
ФИГ.83

Способ 1C: 43-55 дней для этапов A - E	**Способ 2A: примерно 22 дня для этапов A - E**
1. ЭТАП A Получение образца опухоли от пациента	**1. ЭТАП A** Получение образца опухоли от пациента
2. ЭТАП B Фрагментирование и первое размножение от 11 дней до 21 дня	**2. ЭТАП B** Фрагментирование и первое размножение от 3 дней до 14 дней
3. ЭТАП C Переход от первого размножения ко второму размножению Необязательно, хранение до отбора	**3. ЭТАП C** Переход от первого размножения ко второму размножению Отсутствие хранения и закрытая система
4. ЭТАП D Второе размножение IL-2, OKT-3, антигенпредставляющие питающие клетки Необязательно, повторение один или более раз	**4. ЭТАП D** Второе размножение IL-2, OKT-3 и антигенпредставляющие питающие клетки Закрытая система
5. ЭТАП E Сбор ОИЛ из ЭТАПа D	**5. ЭТАП E** Сбор ОИЛ из ЭТАПа D Закрытая система
6. ЭТАП F Окончательное формулирование и/или перенос в инфузионный мешок	**6. ЭТАП F** Окончательное формулирование и/или перенос в инфузионный мешок (необязательно, криоконсервирование)

ФИГ.84

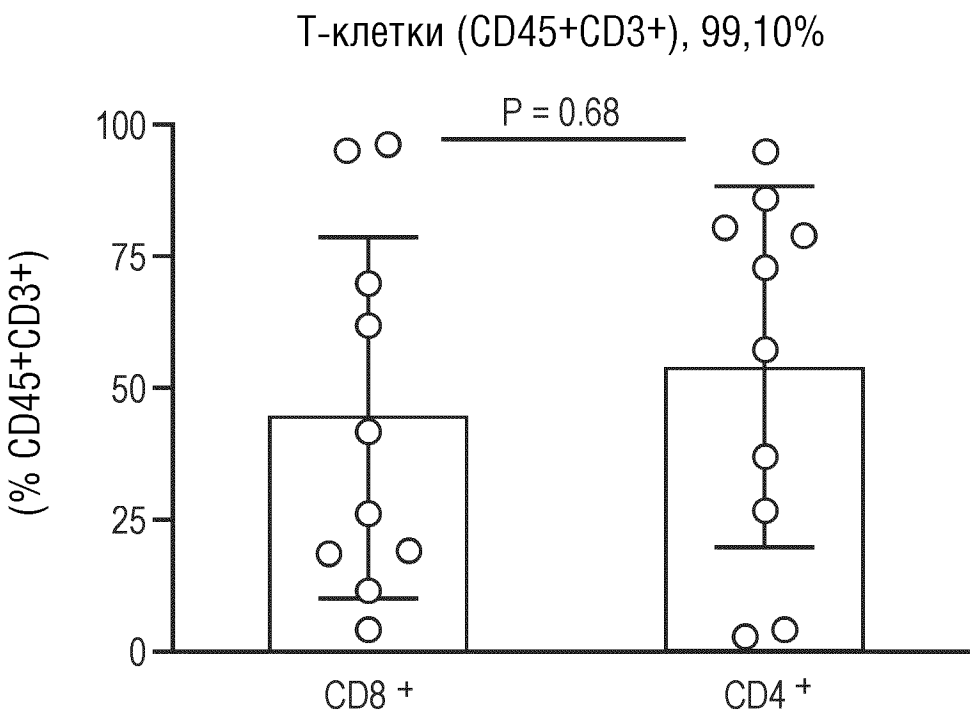
Этап способа	Вариант осуществления способа 1C	Вариант осуществления способа 2A	Преимущества
Пре-ПБР	• 4 фрагмента на 10 флаконов G-REX 10 • Продолжительность 11-21 дней	• 40 фрагментов на 1 флакон G-REX 100M • Продолжительность 11 дней	• Увеличенное количество опухолевых фрагментов на флакон • Сокращенное время культивирования • Сокращенное количество этапов • Возможность использования с закрытой системой
Переход от пре-ПБР к ПБР	• Пре-ПБР ОИЛ замораживают до фенотипирования с целью отбора, затем размораживают для перехода к ПБР (~день 30) • Для ПБР необходимо >40x106 ОИЛ	• Пре-ПБР ОИЛ непосредственно переводят в ПБР в день 11 • Для ПБР необходимо 25-200x106 ОИЛ	• Сокращенный процесс перехода от пре-ПБР к ПБР • Сокращенное количество этапов • Исключение фенотипирования для отбора • Возможность использования с закрытой системой
ПБР	• 6 флаконов G-REX 100M в день 0 ПБР • 5x106 ОИЛ и 5x108 питающих клеток МКПК на флакон в день 0 ПБР • Разделяют на 18-36 флаконов в день 7 ПБР • Продолжительность 14 дней	• 1 флакон G-REX 500M в день 11 • 25-200x106 ОИЛ и 5x109 питающих клеток МКПК в дань 11 • Разделяют на ≤6 флаконов G-REX 500M в день 16 • Продолжительность 11 дней	• Сокращенное количество этапов • Меньшая продолжительность ПБР • Перенос ОИЛ между флаконами в закрытой системе • Замена среды в закрытой системе
Сбор клеток	• ОИЛ собирают центрифугированием	• ОИЛ собирают при помощи автоматизированной системы промывания клеток LOVO	• Сокращенное количество этапов • Автоматизированное промывание клеток • Закрытая система • Уменьшение потерь препарата при промывании
Окончательное формулирование	• Свежий препарат в Hypothermosol • Один инфузионный мешок • Ограниченная стабильность при транспортировке	• Криоконсервированный препарат в PlasmaLyte-A + 1% ЧСА и CS10, хранящийся в LN2 • Множество аликвот • Более длительная стабильность при транспортировке	• Гибкие условия транспортировки • Гибкое расписание для пациента • Более своевременное тестирование выпускаемого препарата
Общее расчетное время процесса	• 43-55 дней	• 22 дня	• Более короткие сроки лечения для пациента

ФИГ.85

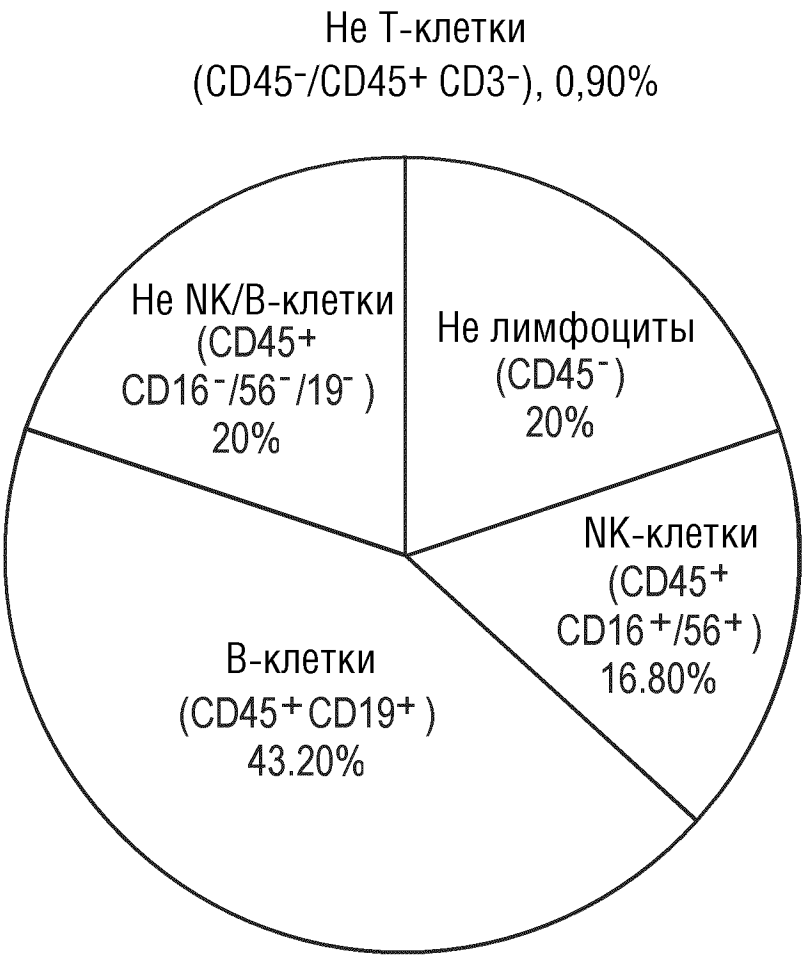

1
2
3
4
5
Активность
Ключевые
важные
атрибуты
качества
Чистота
Идентифик.
хар-ки

ФИГ.86A

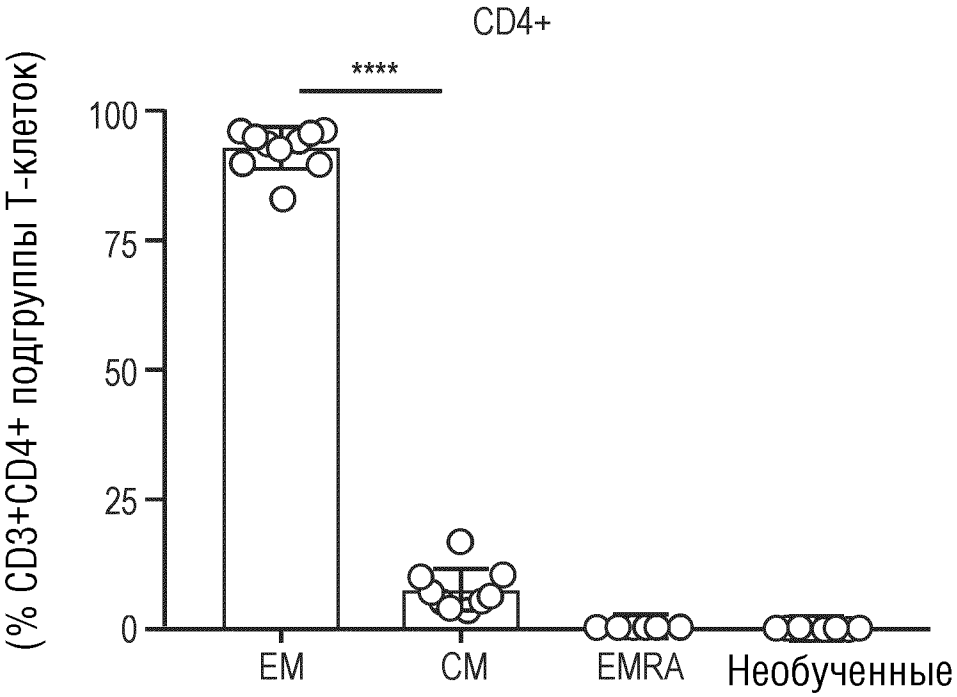
ФИГ.86B



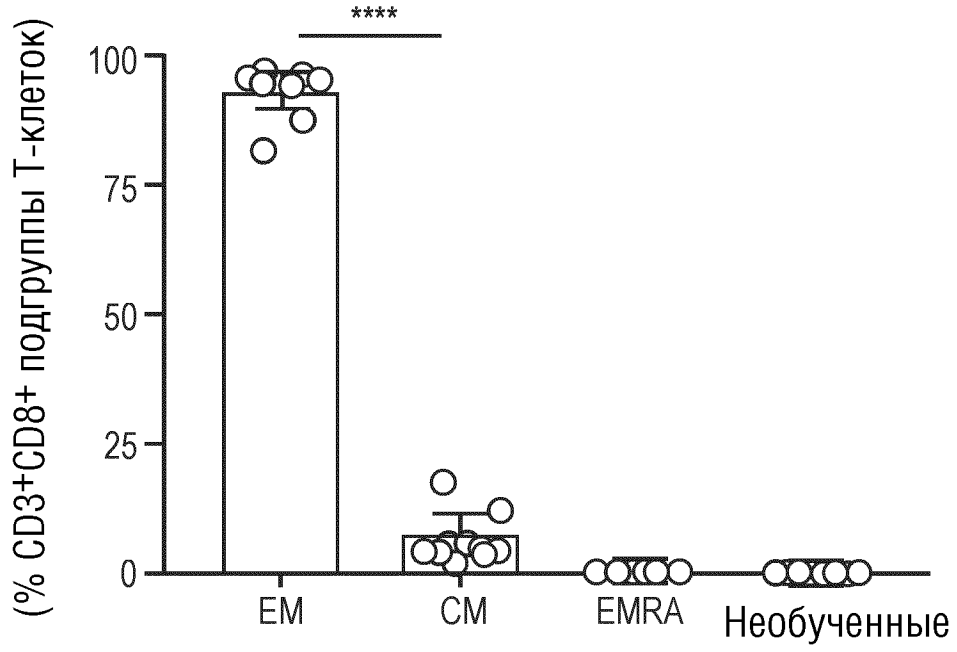
ФИГ.86C


Не Т-клетки
(CD45⁻/CD45+ CD3⁻), 0,90%
Не NK/B-клетки
(CD45+
CD16⁻/56⁻/19⁻)
20%
Не лимфоциты
(CD45⁻)
20%
NK-клетки
(CD45+
CD16+/56+)
16.80%
B-клетки
(CD45+CD19+)
43.20%

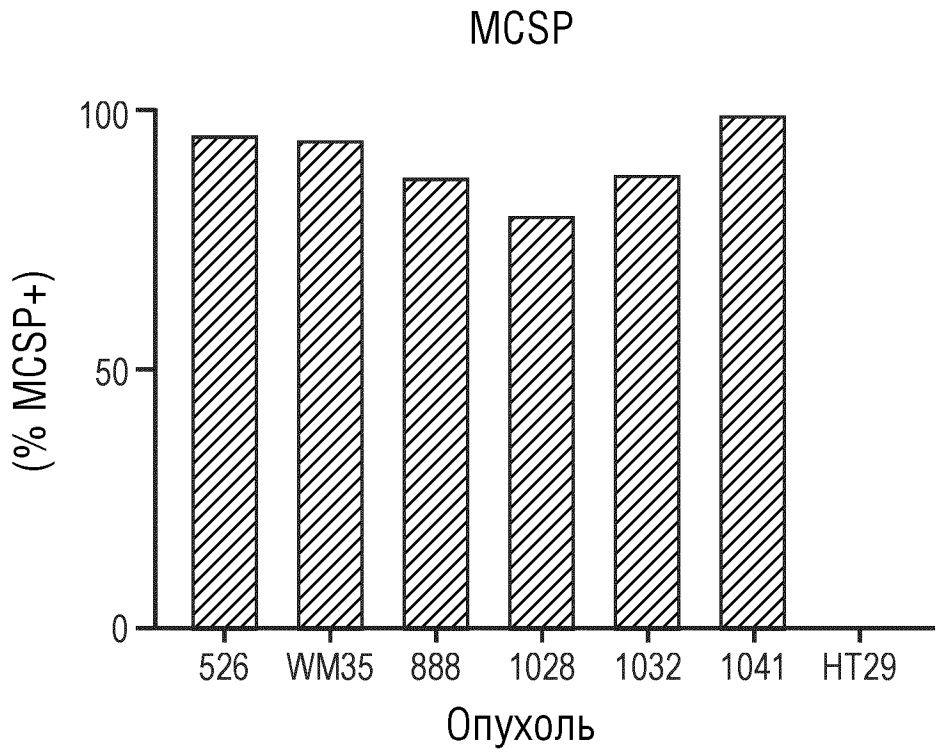
ФИГ.87A



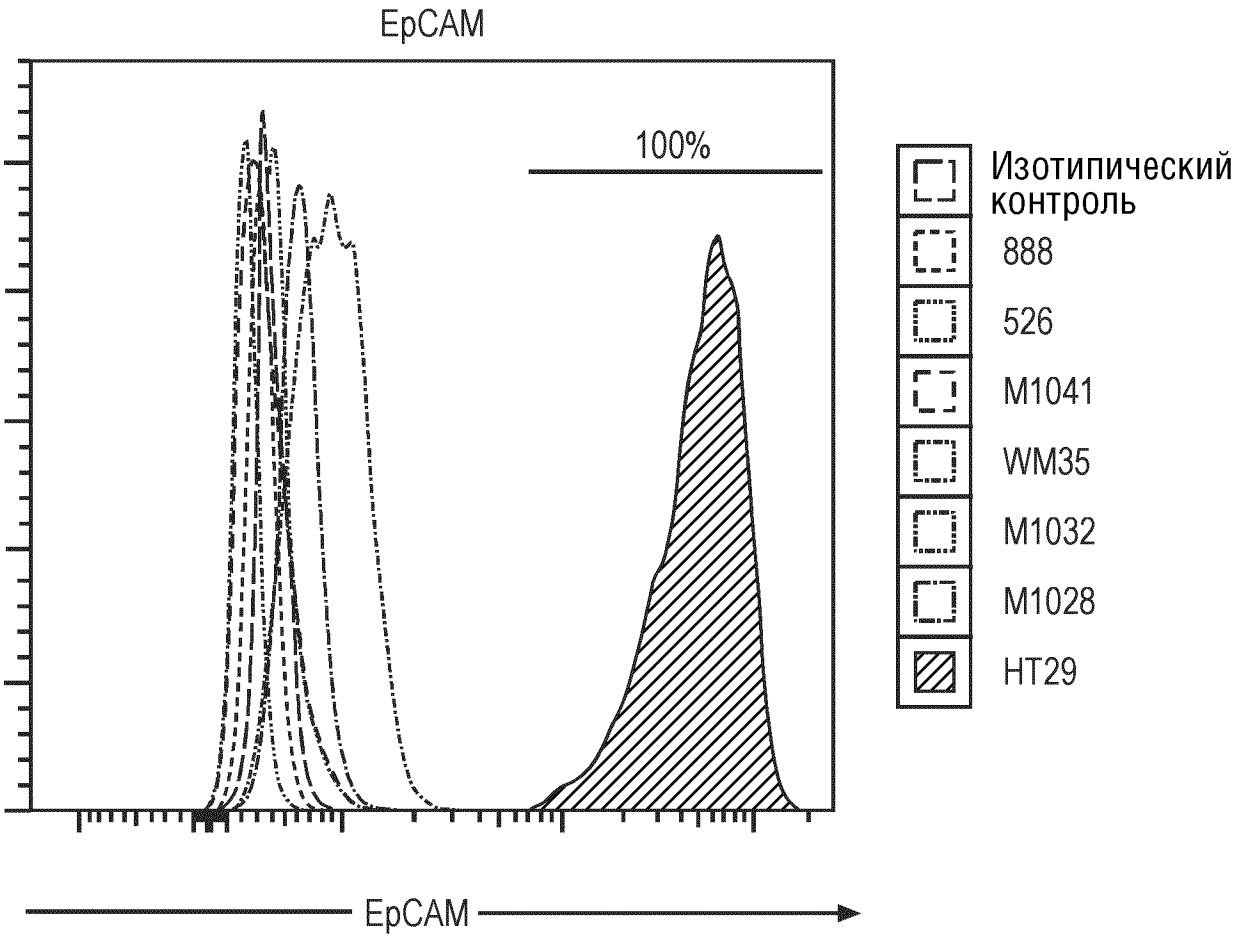
ФИГ.87B



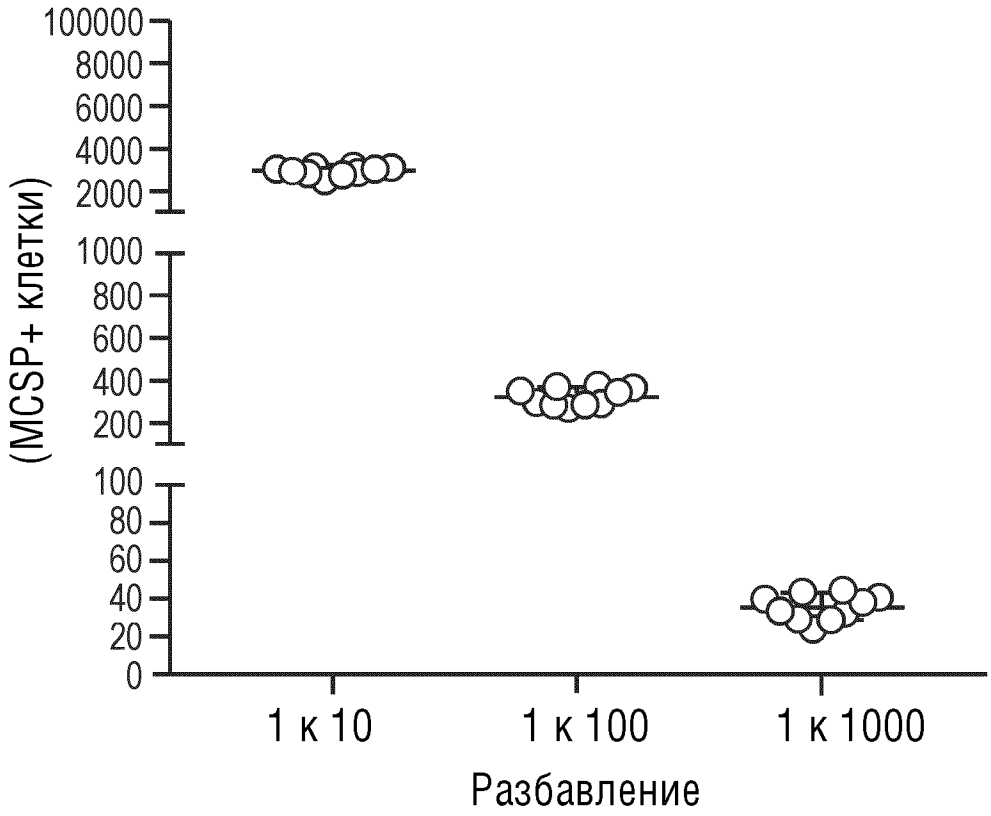
ФИГ.88A



ФИГ.88B



ФИГ.89A



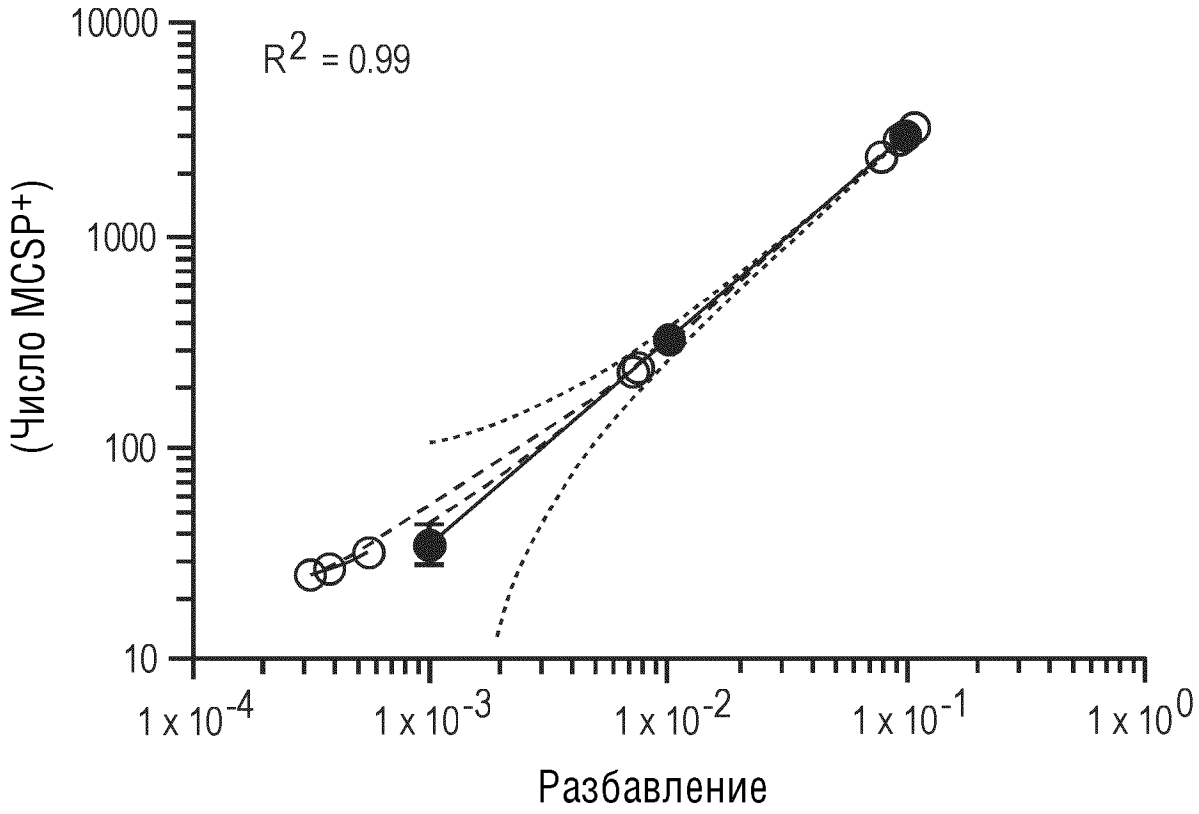
ФИГ.89B

РАЗБАВЛЕНИЕ	СРЕДНЕЕ	SD	ВЕРХНИЙ ПРЕДЕЛ (СРЕДНЕЕ + 3 SD)	НИЖНИЙ ПРЕДЕЛ (СРЕДНЕЕ – 3 SD)
1 к 10	2976	203	3585	2367
1 к 100	322	39	440	204
1 к 1000	36	7	56	16

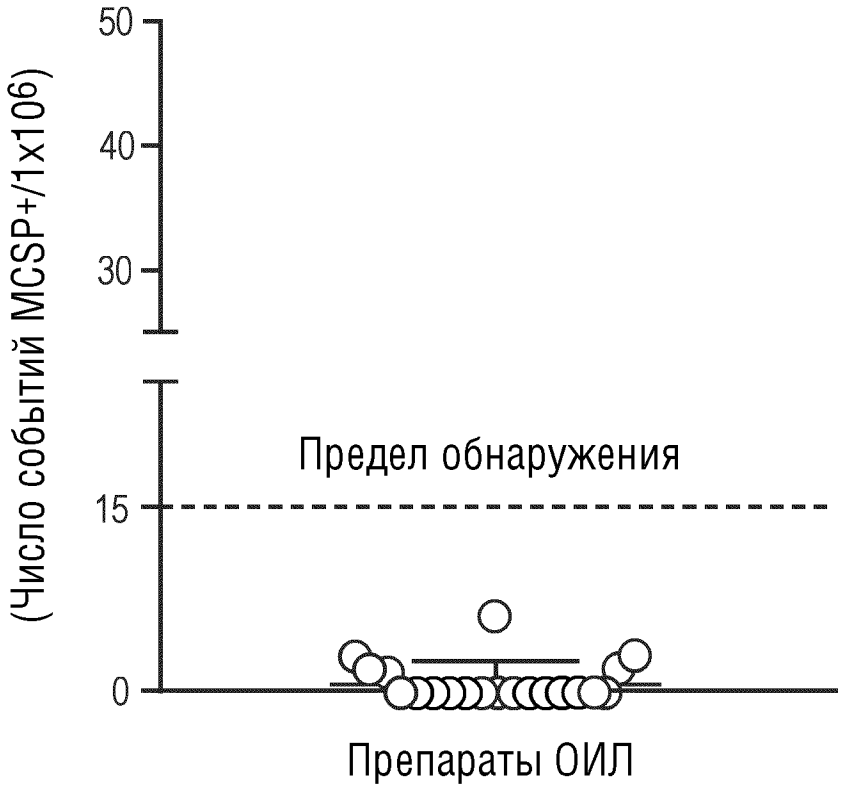
ФИГ.90A

РАЗБАВЛЕНИЕ	ДИАПАЗОН (ВЕРХ-НИЗ)	ЭКСП. №1 (СРЕДНЕЕ)	ЭКСП. №2 (СРЕДНЕЕ)	ЭКСП. №3 (СРЕДНЕЕ)
1 к 10	3585-2367	2814	3282	2367
1 к 100	440-204	227	320	239
1 к 1000	56-16	27	25	32

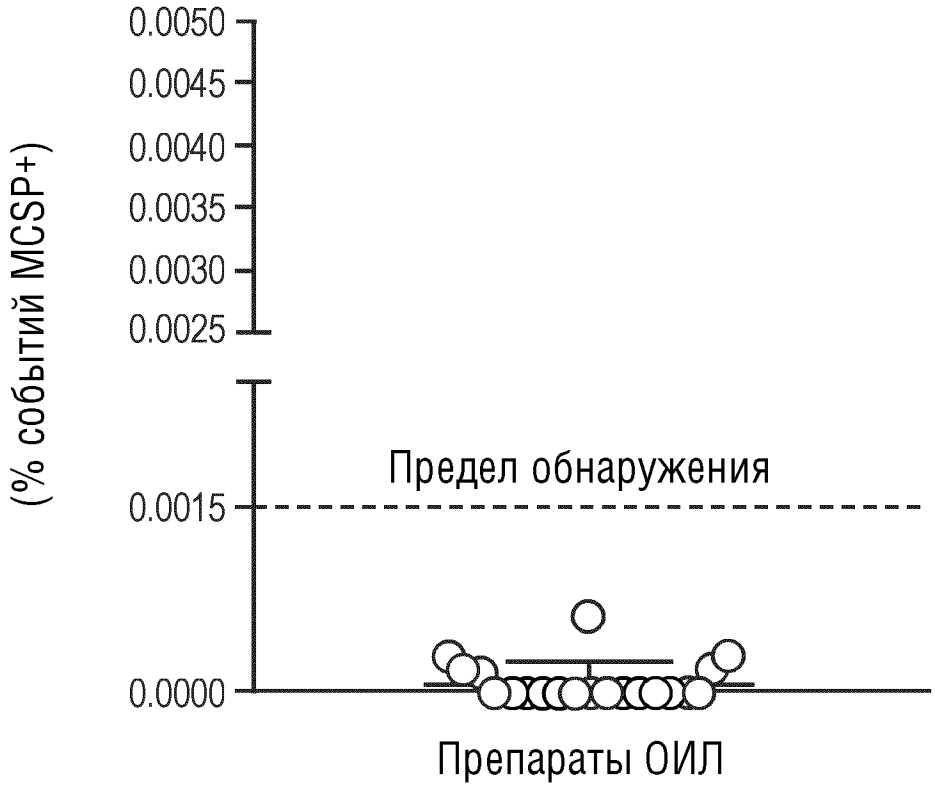
ФИГ.90B



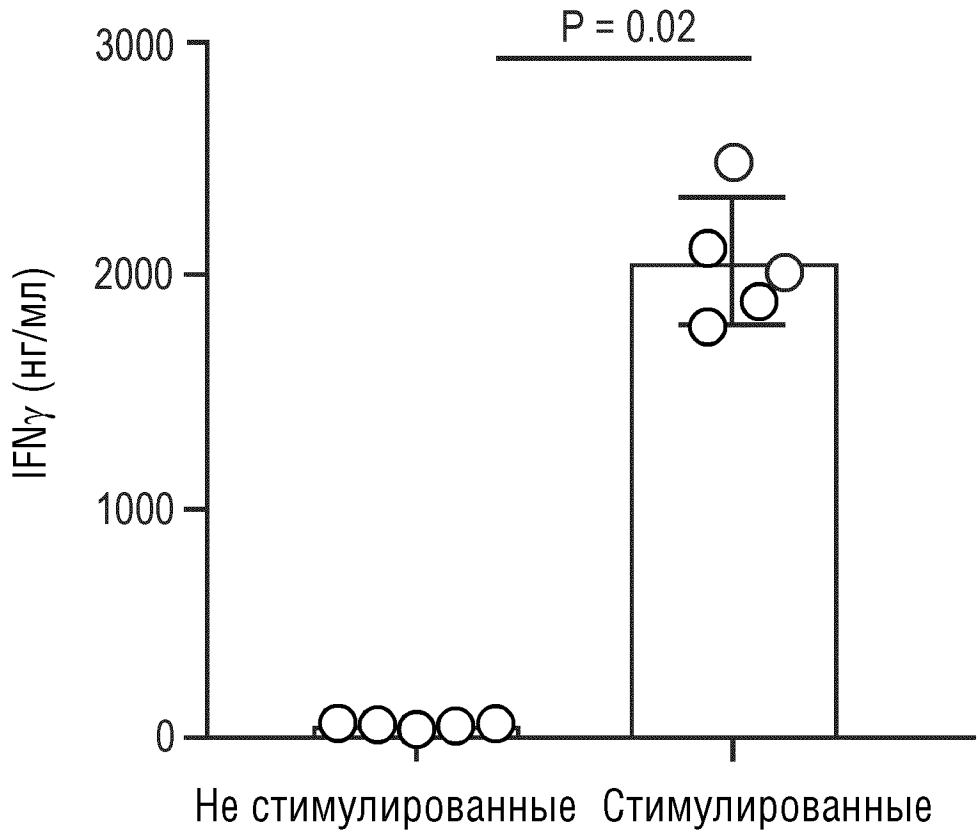
ФИГ.91A



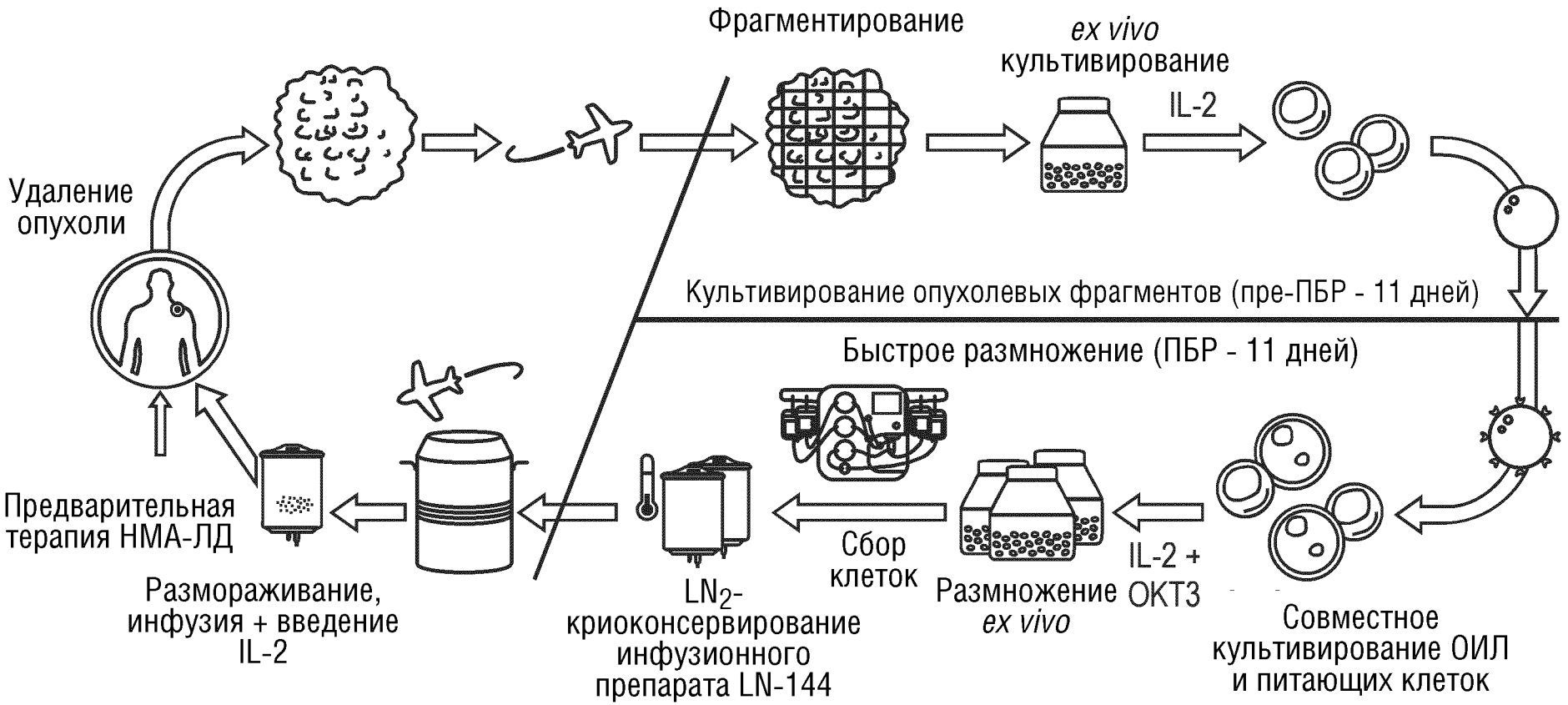
ФИГ.91B



ФИГ.92


P = 0.02
3000
2000
1000
0
IFNγ (нг/мл)
Не стимулированные
Стимулированные

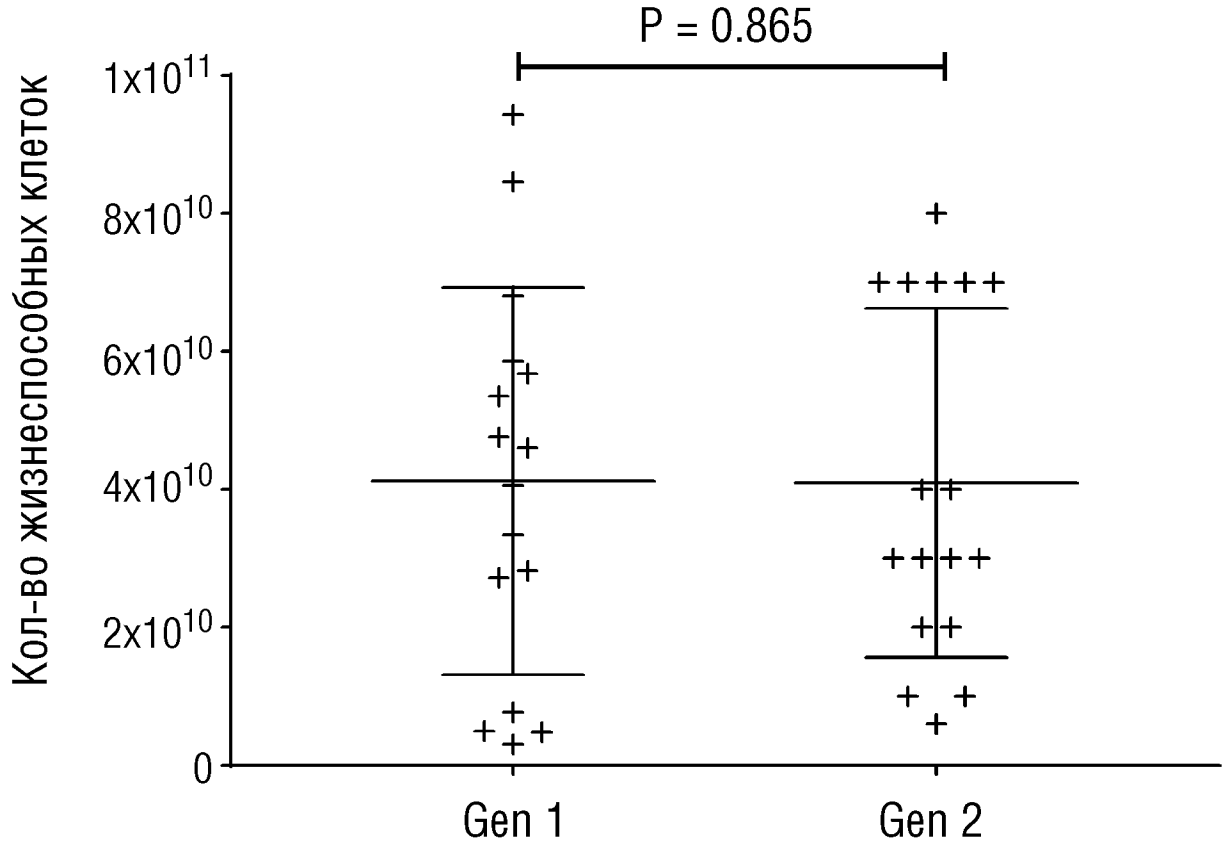
ФИГ.93


Фрагментирование
ex vivo
культивирование
IL-2
Удаление
опухоли
Культивирование опухолевых фрагментов (пре-ПБР - 11 дней)
Быстрое размножение (ПБР - 11 дней)
Предварительная
терапия НМА-ЛД
Сбор
клеток
IL-2 +
OKT3
Размораживание,
инфузия + введение
IL-2
LN2-
криоконсервирование
инфузионного
препарата LN-144
Размножение
ex vivo
Совместное
культивирование ОИЛ
и питающих клеток

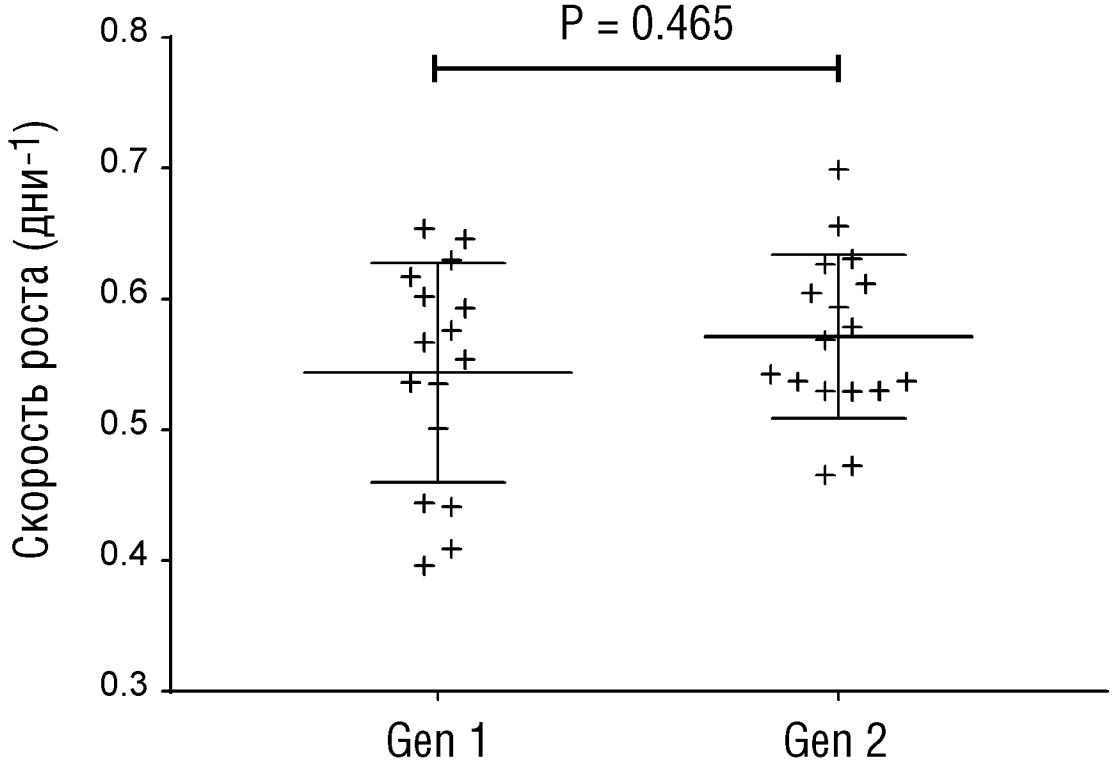
ФИГ.94

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

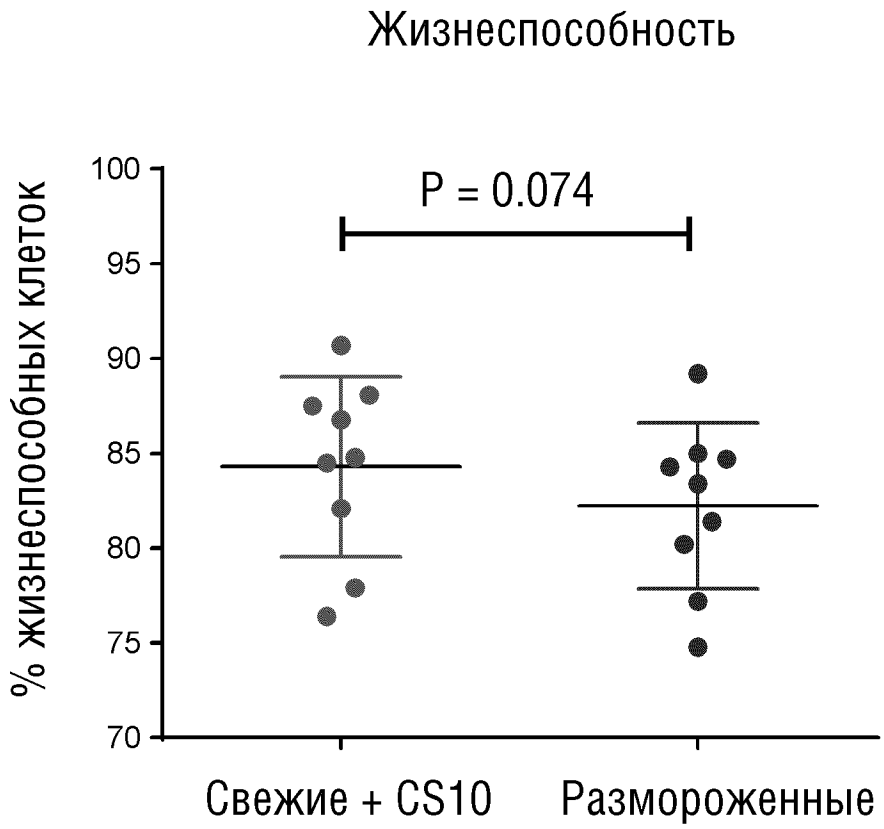
ФИГ.95A



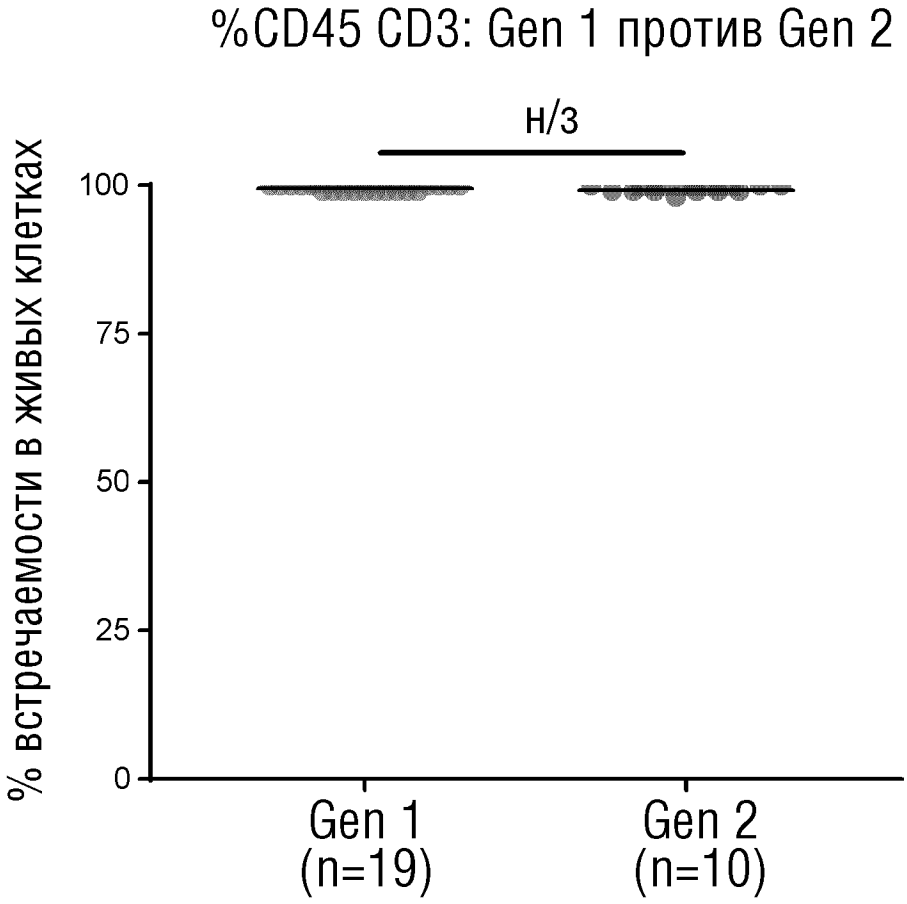
ФИГ.95B



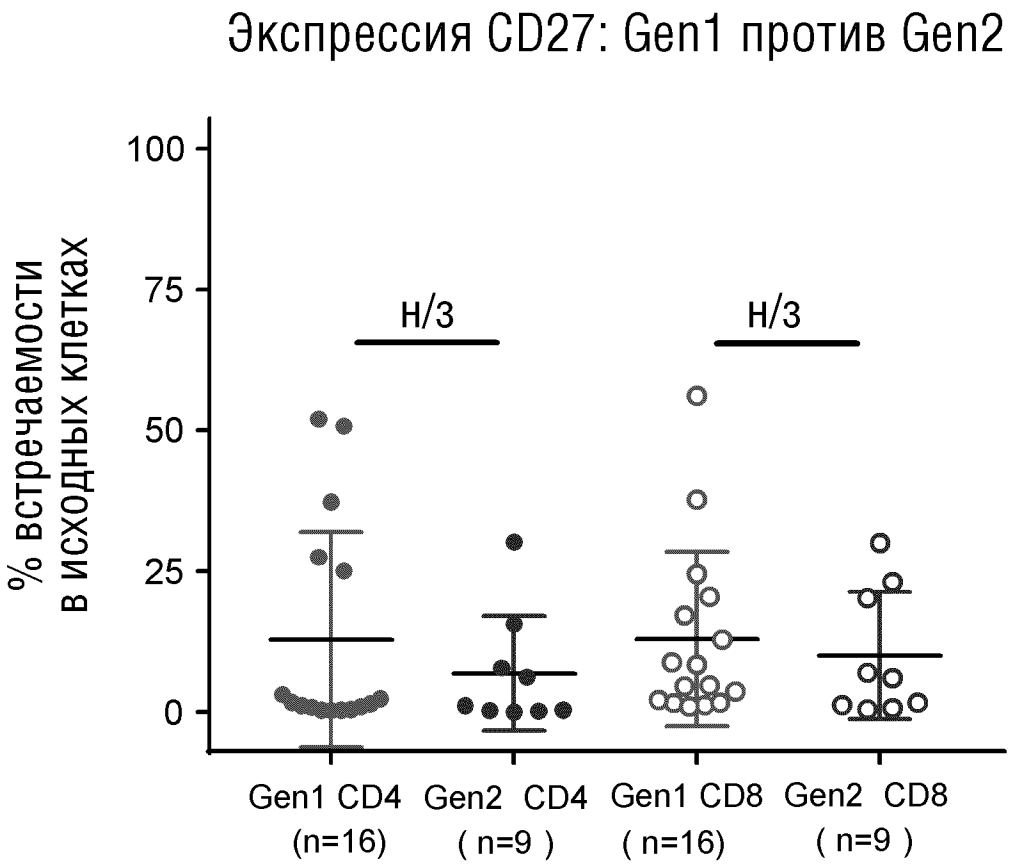
ФИГ.95С



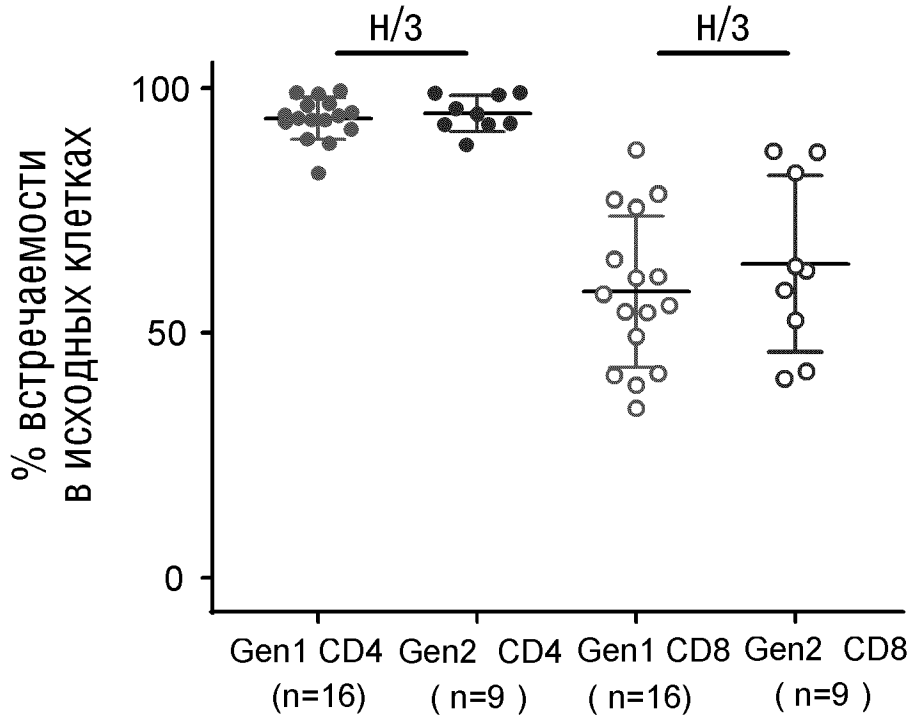
ФИГ.96А



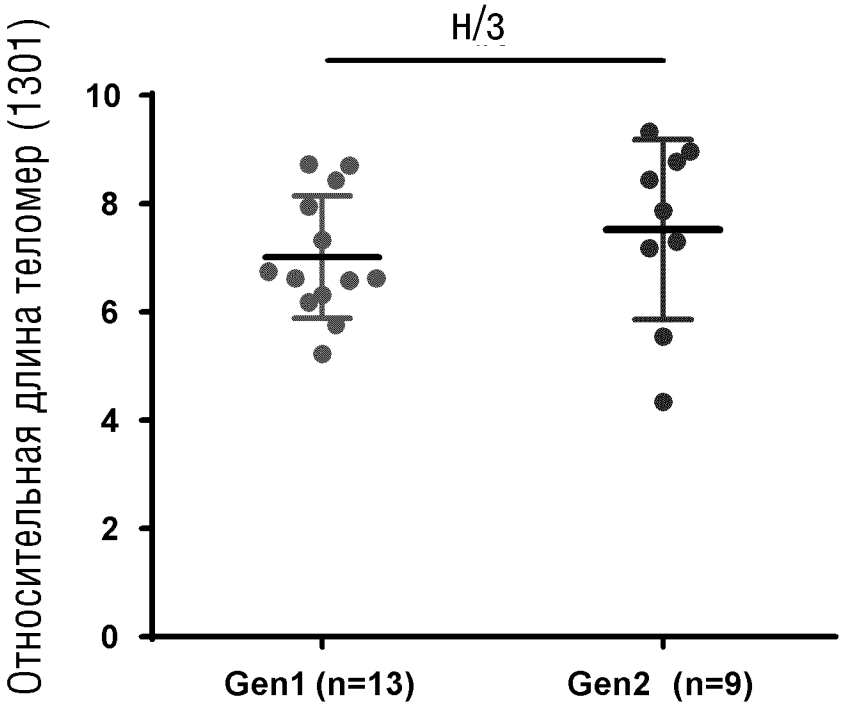
ФИГ.96B



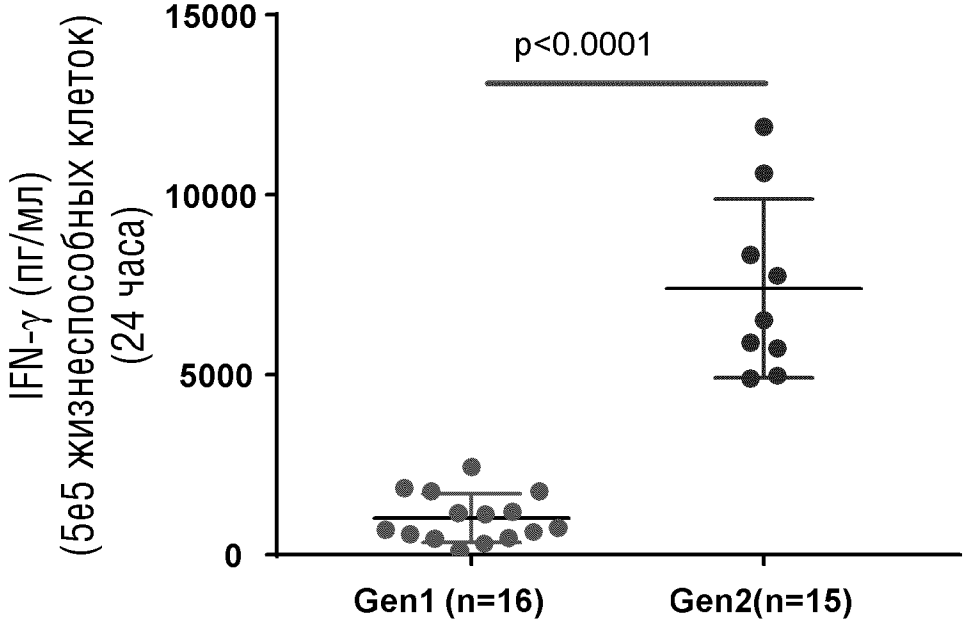
ФИГ.96C



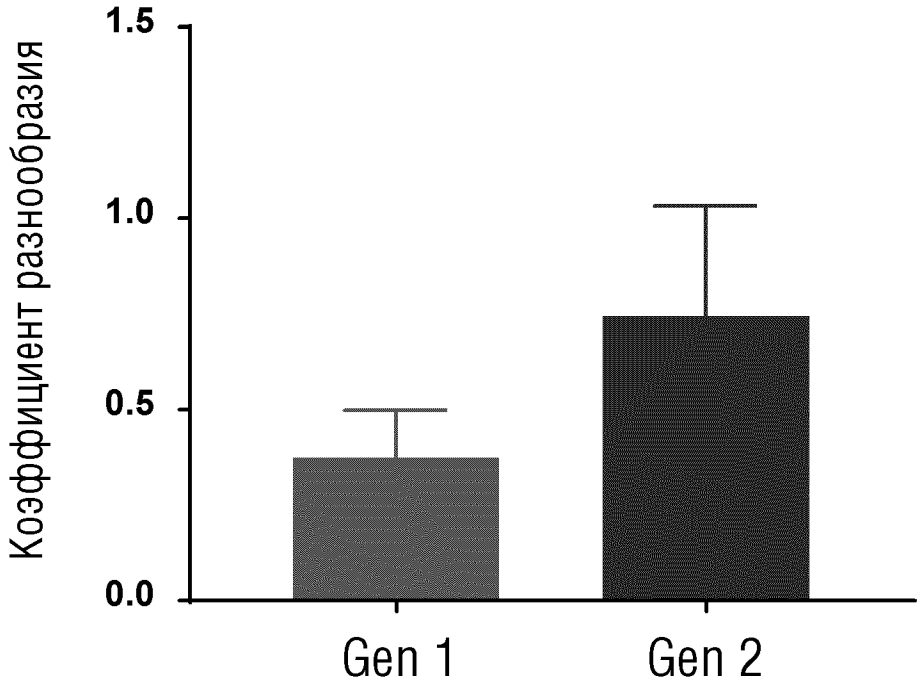
ФИГ.97


H/3
Относительная длина теломер (1301)
10
8
6
4
2
0
Gen1 (n=13)
Gen2 (n=9)

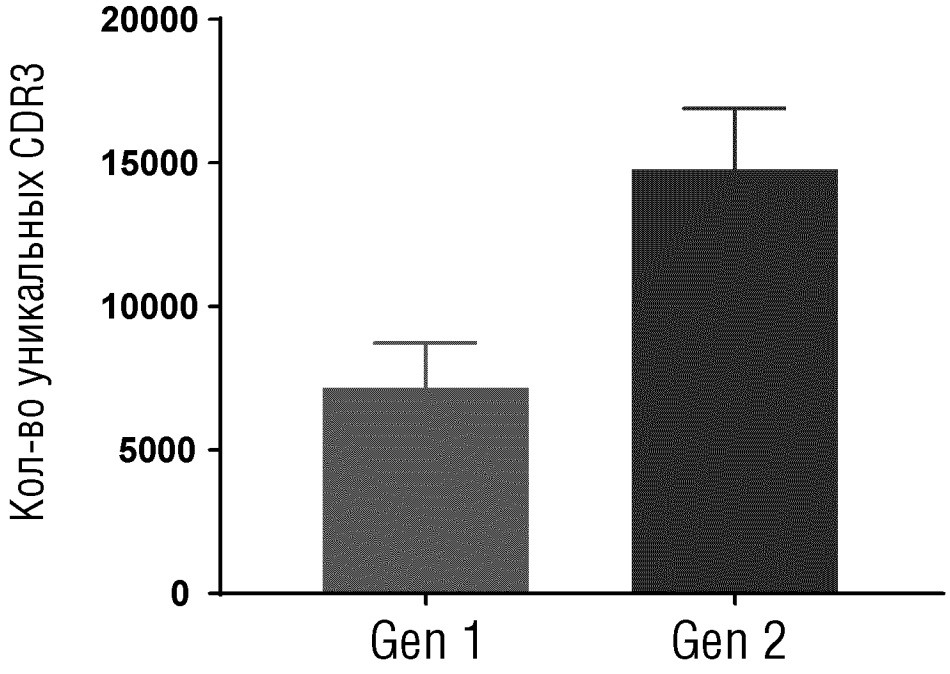
ФИГ.98


IFN-γ (пг/мл)
(5e5 жизнеспособных клеток)
(24 часа)
15000
10000
5000
0
p<0.0001
Gen1 (n=16)
Gen2(n=15)

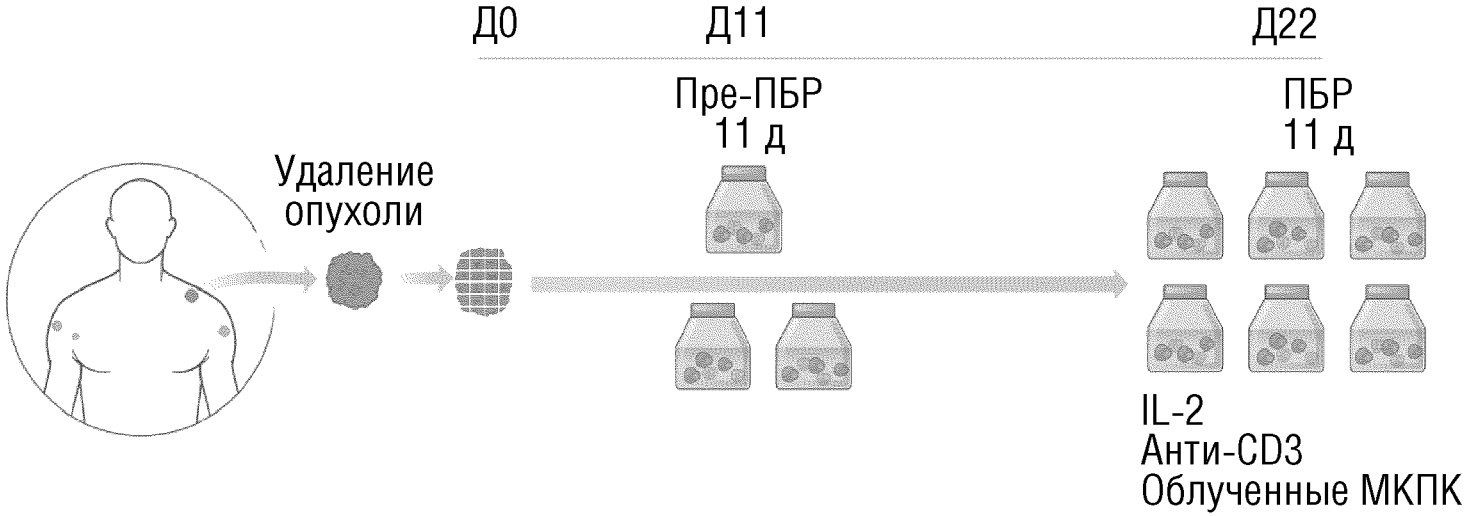
ФИГ.99A



ФИГ.99B



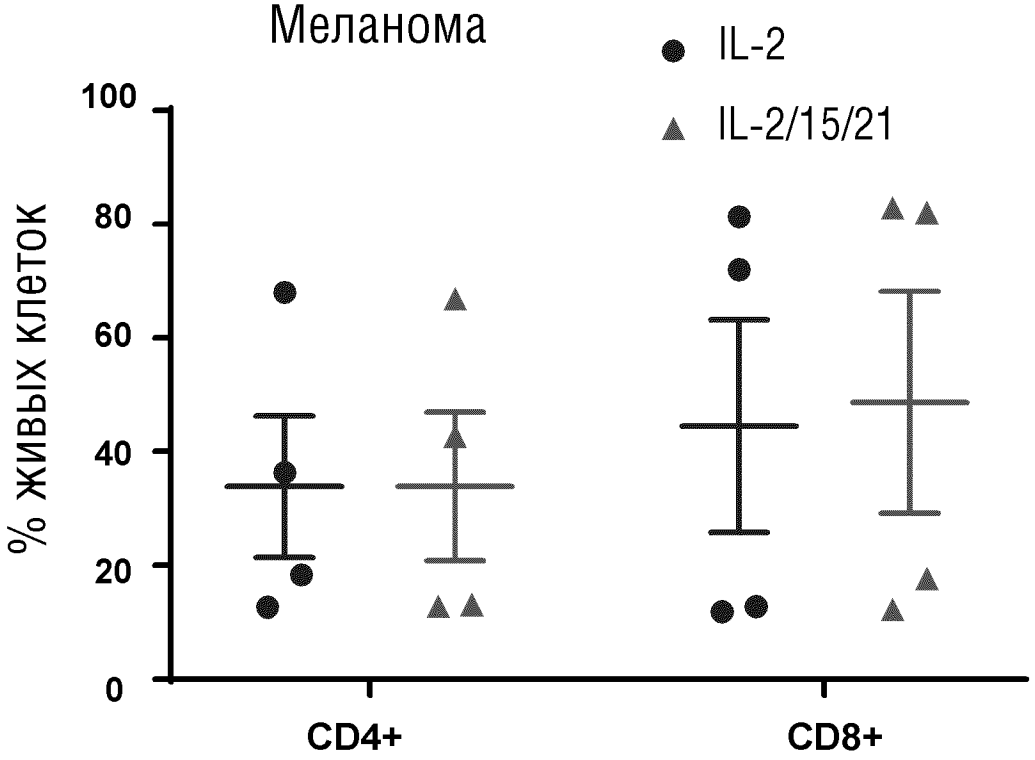
ФИГ.100



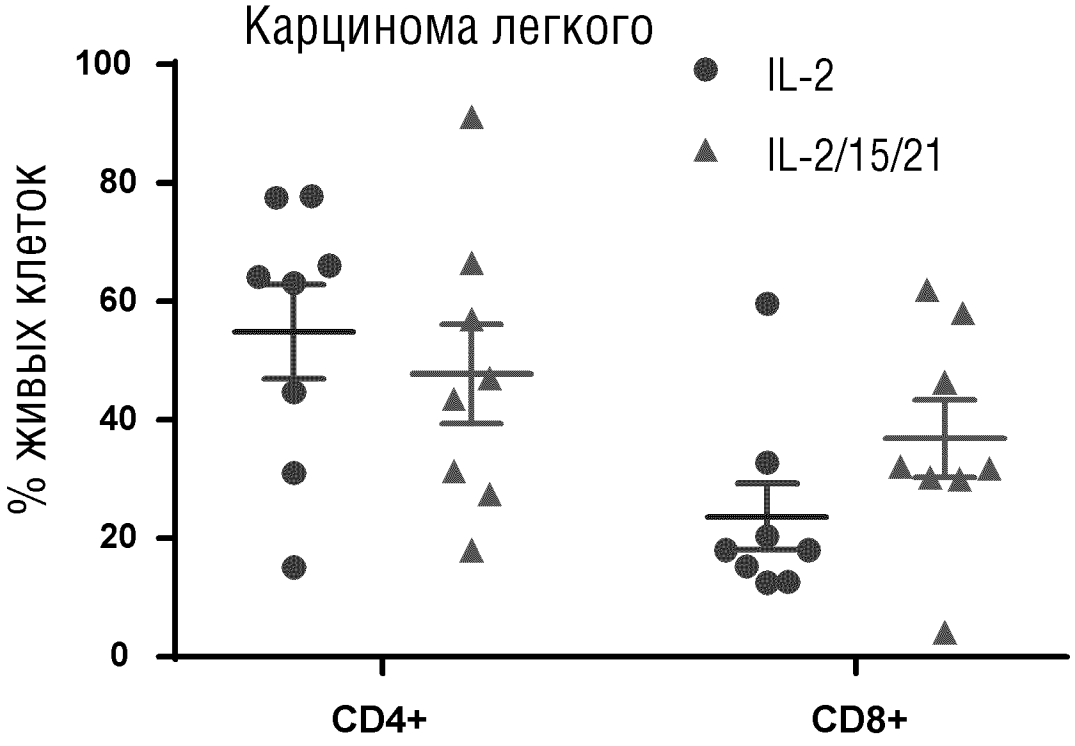
ФИГ.101

Гистология опухоли	Количество исследований, демонстрирующих >20% увеличение показателей роста при использовании IL-2/IL-15/IL-21 (в сравнении с IL-2)
Меланома	**1/5 (20%)**
Рак легкого	**3/8 (38%)**
Колоректальный рак	7/11 (63%)
Рак шейки матки	1/1 (100%)
Рак поджелудочной железы	2/2 (100%)
Глиобластома	1/1 (100%)
Трижды негативный рак молочной железы	1/2 (50%)

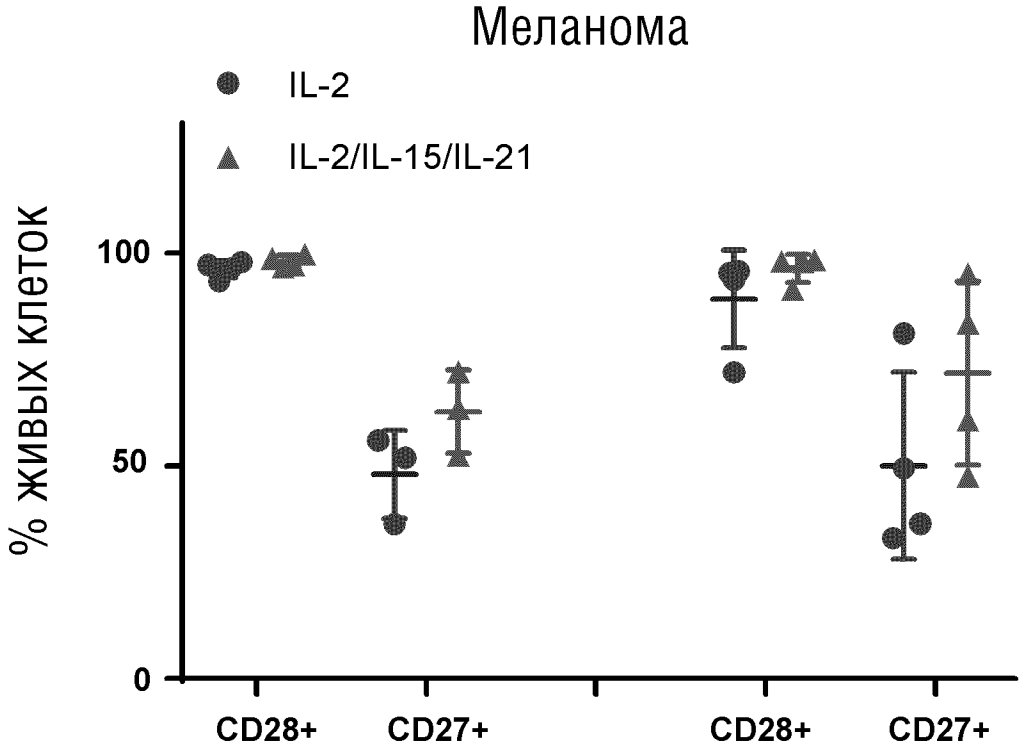
ФИГ.102A



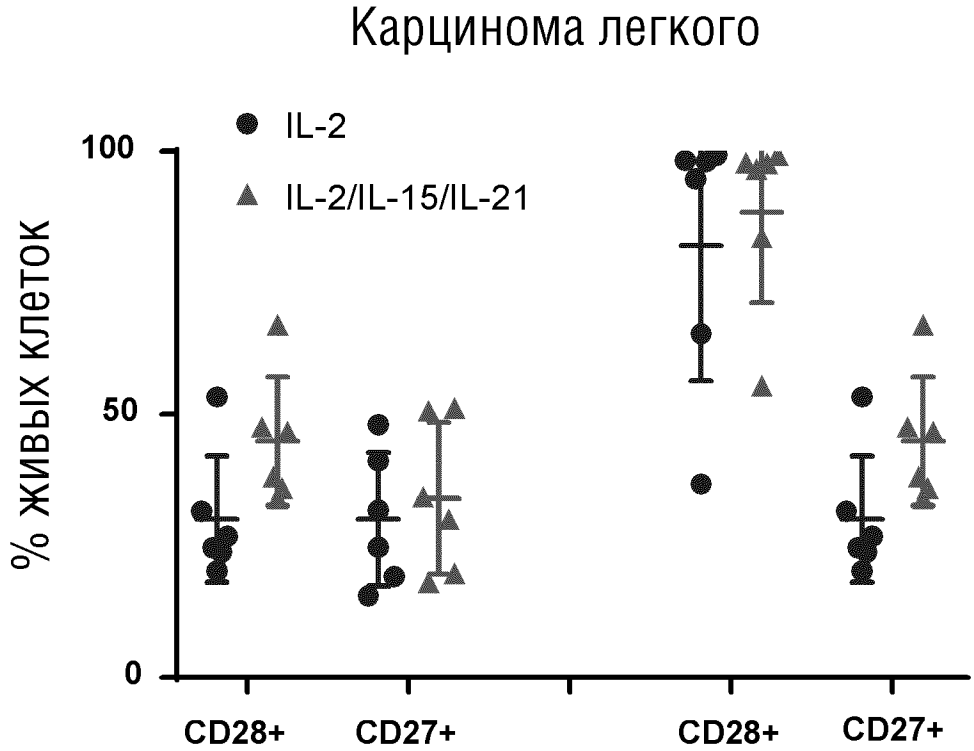
ФИГ.102B



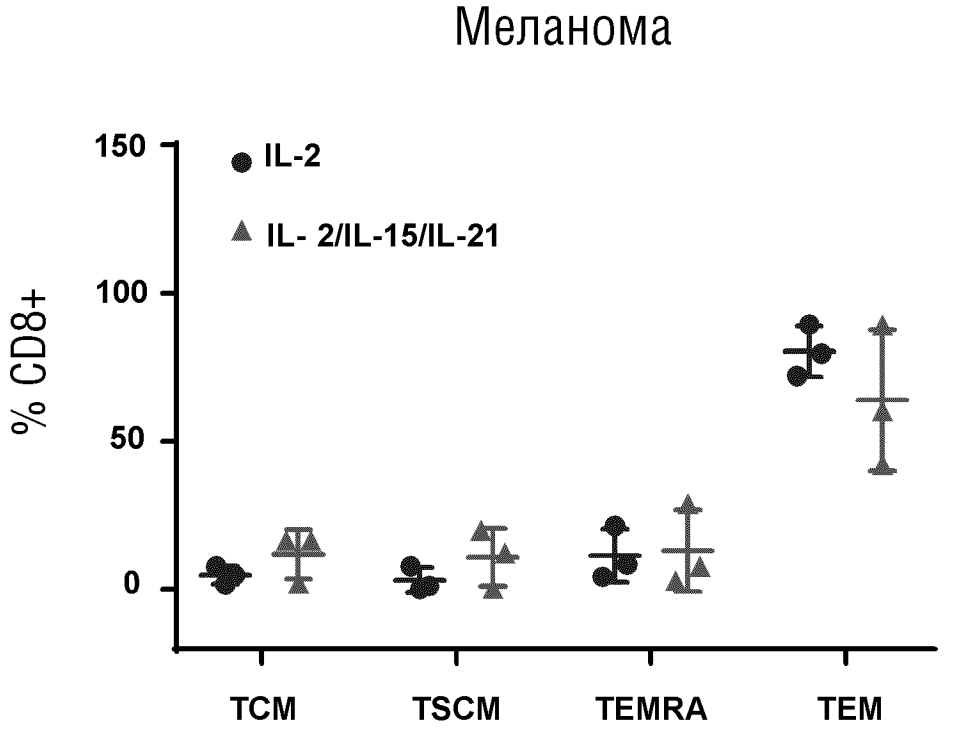
ФИГ.103A



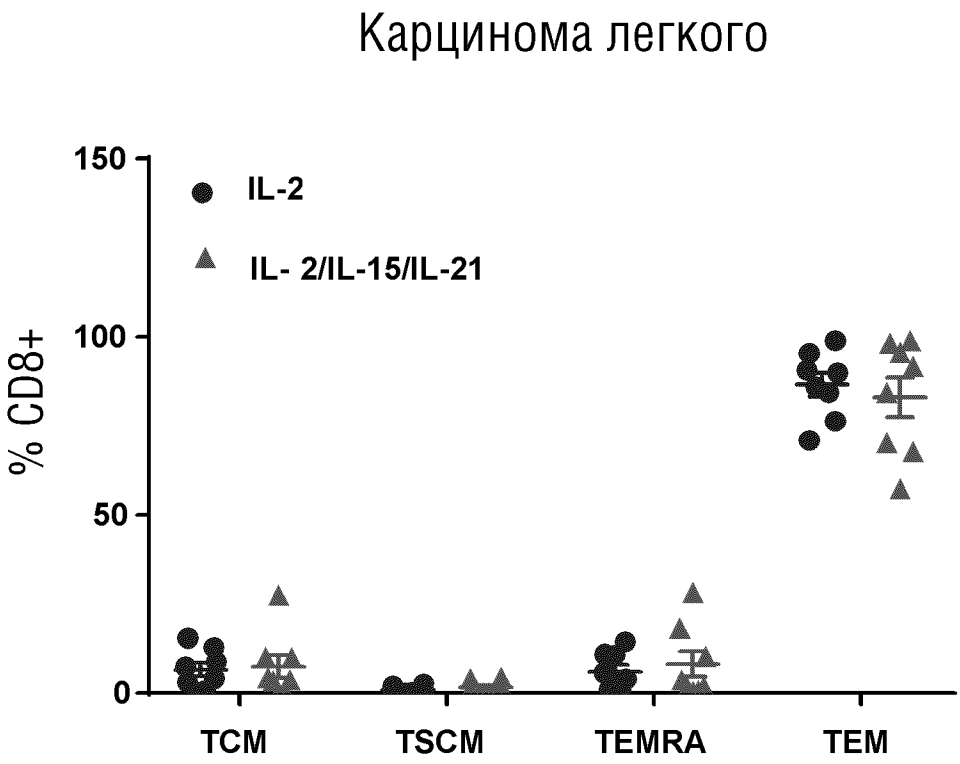
ФИГ.103B



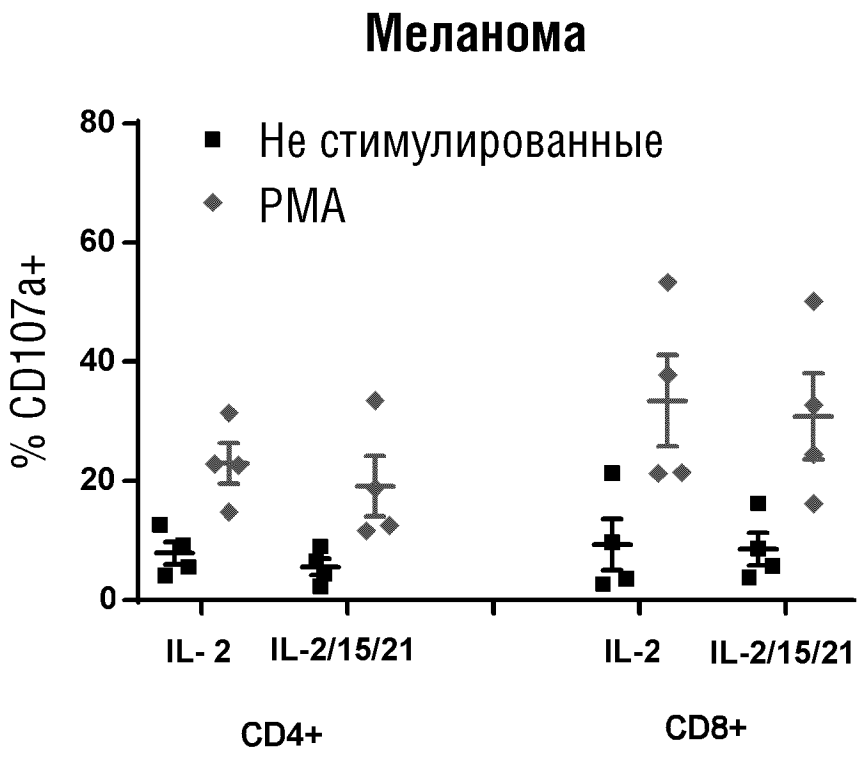
ФИГ.104A



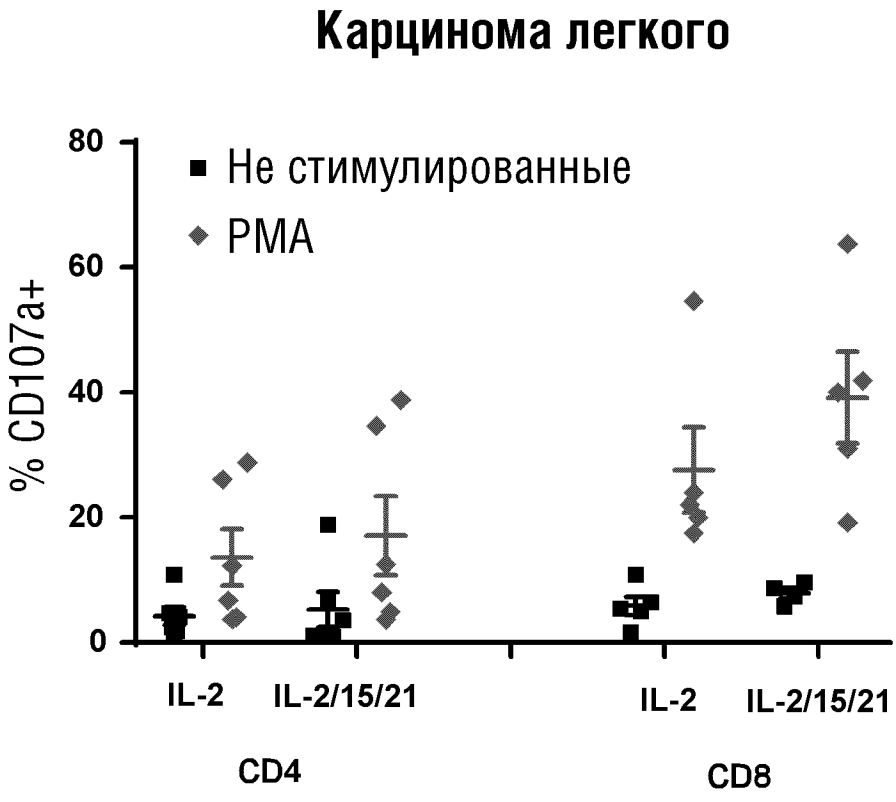
ФИГ.104B



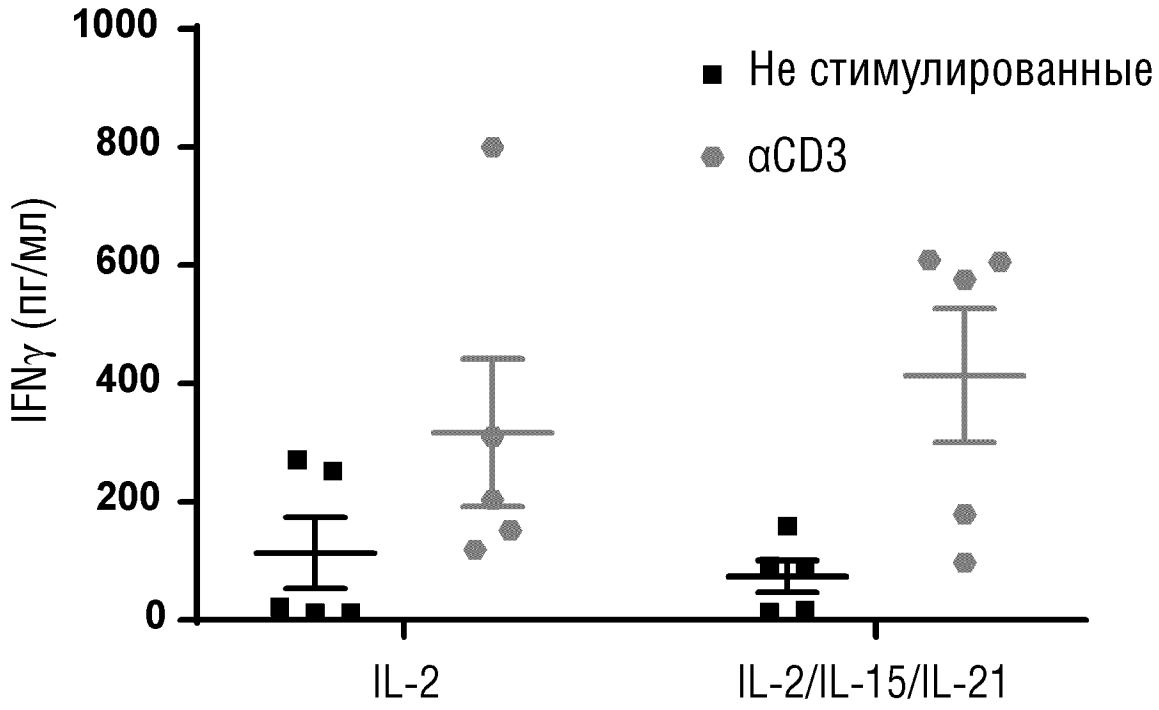
ФИГ.105A



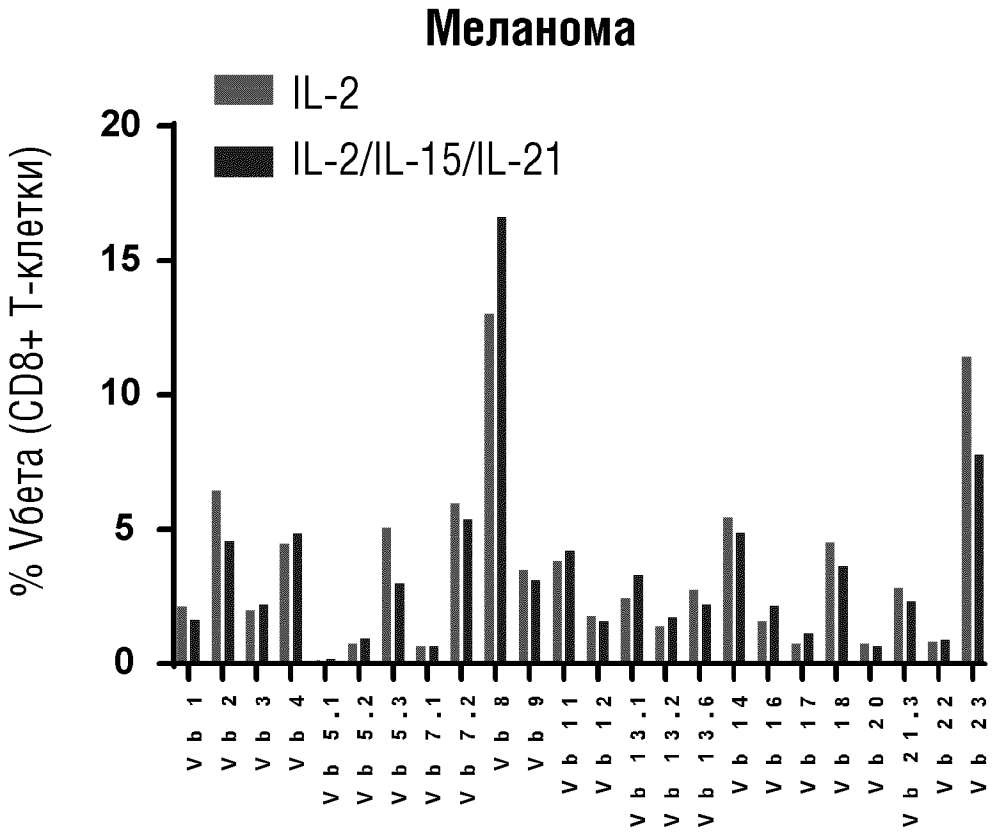
ФИГ.105B

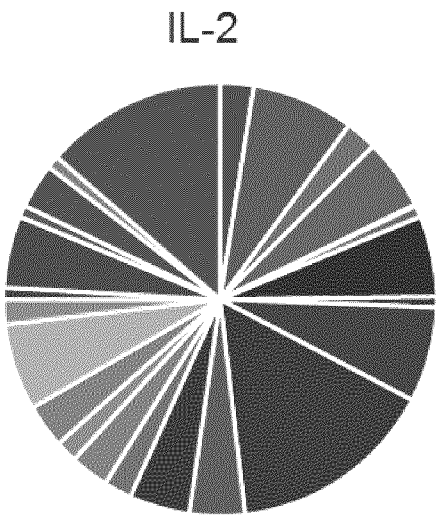


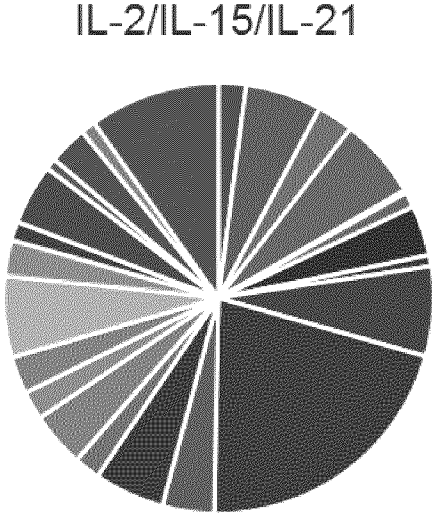
ФИГ.105С


1000
800
600
400
200
0
IFNγ (пг/мл)
Не стимулированные
αCD3
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21

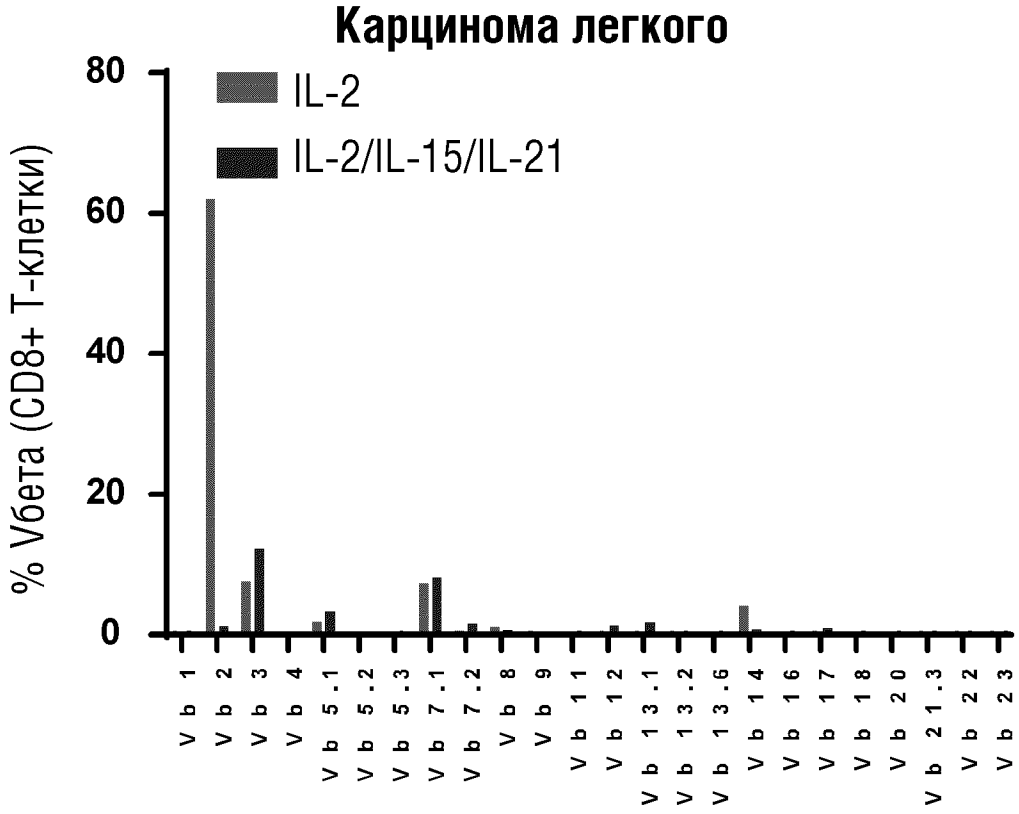
ФИГ.106А

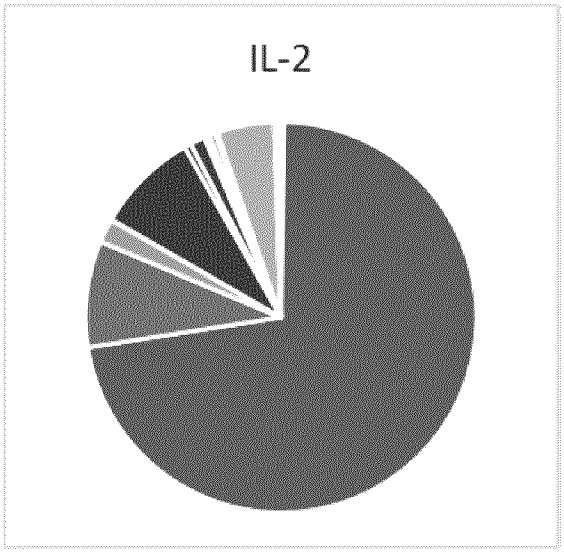

Меланома
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% Vбета (CD8+ Т-клетки)
20
15
10
5
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23

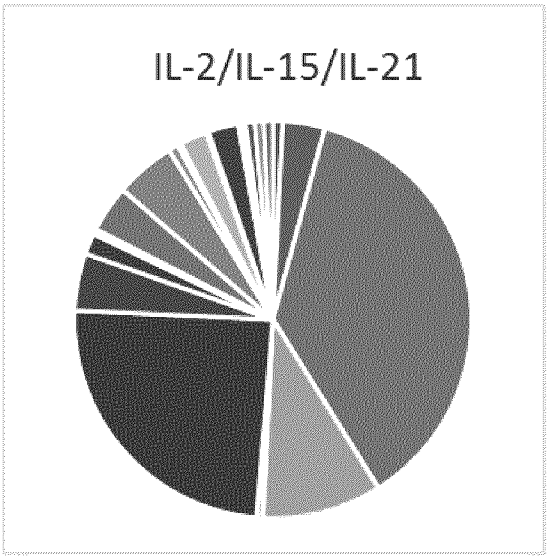

IL-2


IL-2/IL-15/IL-21

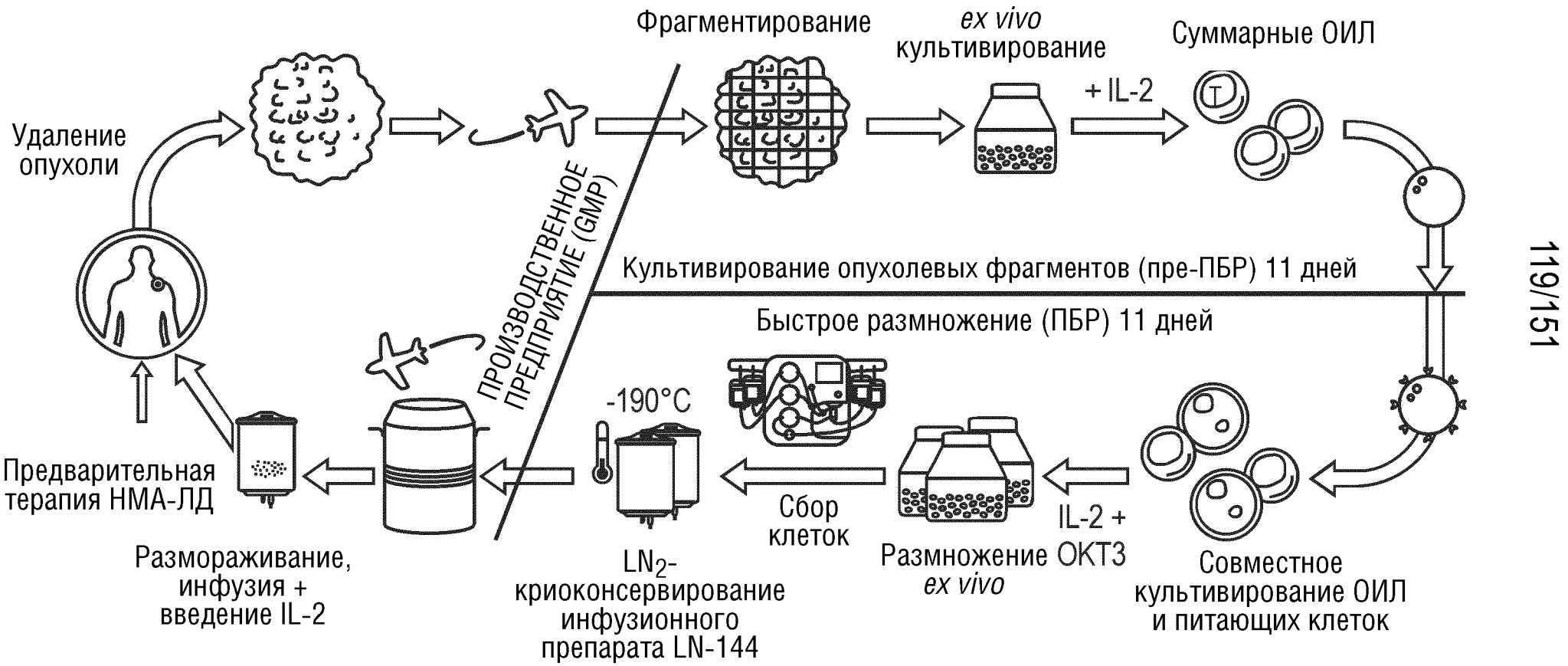
ФИГ.106B


Карцинома легкого
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% Vбета (CD8+ Т-клетки)
80
60
40
20
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23

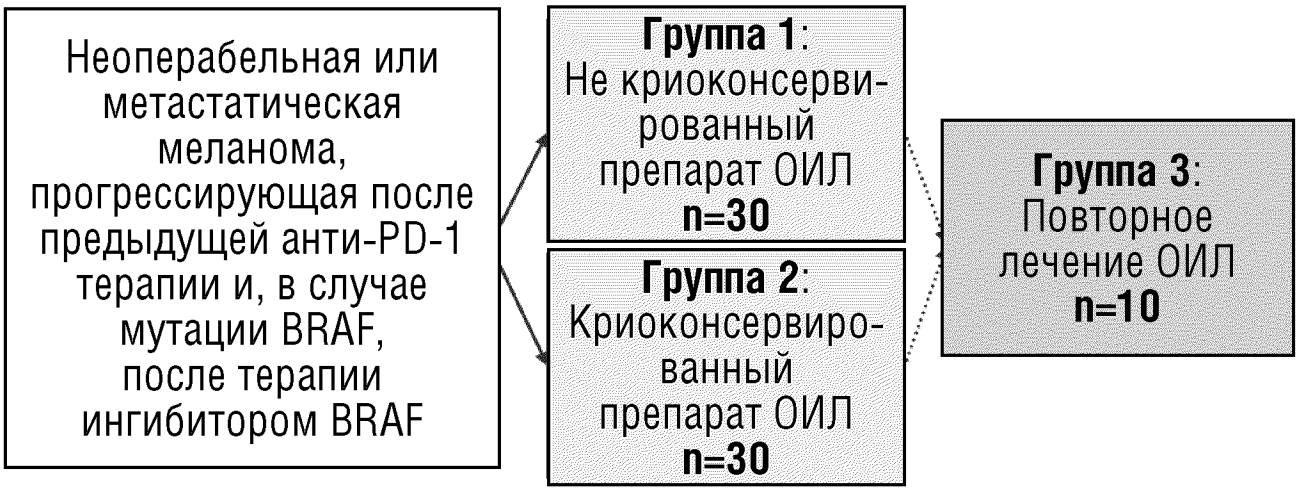

IL-2


IL-2/IL-15/IL-21

ФИГ.107


Удаление опухоли
Фрагментирование
ex vivo культивирование
+ IL-2
Суммарные ОИЛ
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ (GMP)
Культивирование опухолевых фрагментов (пре-ПБР) 11 дней
Быстрое размножение (ПБР) 11 дней
Предварительная терапия НМА-ЛД
-190°C
Сбор клеток
IL-2 + OKT3
Размножение ex vivo
Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток
Размораживание, инфузия + введение IL-2
LN2- криоконсервирование инфузионного препарата LN-144

ФИГ.108


Неоперабельная или метастатическая меланома, прогрессирующая после предыдущей анти-PD-1 терапии и, в случае мутации BRAF, после терапии ингибитором BRAF
Группа 1: Не криоконсервированный препарат ОИЛ **n=30**
Группа 2: Криоконсервированный препарат ОИЛ **n=30**
Группа 3: Повторное лечение ОИЛ **n=10**

ФИГ.109

ХАРАКТЕРИСТИКИ	Предыдущий способ Группа 1* N = 16 (%)	Группа 2 N = 13 (%)
Пол, n (ц%)		
Мужчины	7(44)	5(39)
Женщины	9(56)	8(62)
Возраст		
Средний	55	54
Мин, Макс	41,72	35, 66
Предыдущее лечение, n (%)		
Среднее количество предшествующих системных видов лечения	3	4
Анти-CTLA-4	14 (88)	13(100)
Анти-PD-1	21 (100)	13(100)
Сумма диаметров целевой лезии (мм)		
Среднее (SD)	104 (68)	141 (102)
Мин, Макс	15, 225	38, 342

ХАРАКТЕРИСТИКИ	Предыдущий способ Группа 1 N = 16(%)	Группа 2 N = 13(%)
Исходный показатель ECOG, n (%)		
0	9(56)	8(62)
1	7(44)	5(39)
Статус BRAF, n (%)		
Мутантный	9(56)	6(46)
Дикого типа	7(44)	7(54)
Исходный показатель LDH (Ед/л [SD])		
1-2-кратный ВПН	7(44)	7(54)
Мин, Макс	1(6)	2(15)
Количество целевых и не целевых лезий (в начале исследования)		
>3	12(75)	10(77)
Среднее	5,6	5,5

ФИГ.110

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЙ ТЕРМИН	Предыдущий способ Группа 1 (N = 16)			Группа 2 (N = 13)		
	Любая степень n (%)	Степень 3/4 n (%)	Степень 5 n (%)	Любая степень n (%)	Степень 3/4 n (%)	Степень 5 n (%)
Количество пациентов, сообщивших о по меньшей мере одном возникшим в ходе лечения НЯ	14(87,5)	14(87,5)	0	12 (85,7)	11 (78,6)	0
Тошнота	14(87,5)	0	0	7 (53,8)	0	0
Уменьшение кол-ва тромбоцитов	12(75,0)	12(75,0)	0	7 (53,8)	6 (46,2)	0
Анемия	11 (68,8)	8 (50,0)	0	8(61,5)	7 (53,8)	0
Уменьшение кол-ва нейтрофилов	11 (68,8)	11(68,8)	0	6 (46,2)	6 (46,2)	0
Фебрильная нейтропения	10(62,5)	10(62,5)	0	7 (53,8)	6 (46,2)	0
Уменьшение кол-ва лейкоцитов	10(62,5)	10(62,5)	0	6 (46,2)	6 (46,2)	0
Озноб	9 (56,3)	0	0	6 (46,2)	1 (7,7)	0
Диарея	8 (50,0)	1 (6,3)	0	4 (30,8)	0	0
Усталость	7 (43,8)	0	0	7 (53,8)	0	0
Рвота	7 (43,8)	0	0	2(15,4)	0	0
Запор	6 (37,5)	0	0	3(23,1)	0	0
Снижение аппетита	5(31,3)	0	0	4 (30,8)	0	0
Головная боль	5(31,3)	0	0	3(23,1)	0	0
Гипокальцемия	5(31,3)	0	0	1 (7,7)	0	0
Гипокалиемия	5(31,3)	0	0	3(23,1)	0	0
Гипофосфатемия	5(31,3)	5(31,3)	0	4 (23,1)	1 (7,7)	0
Гипотензия	5(31,3)	2(12,5)	0	3(23,1)	3 (7,7)	0
Уменьшение кол-ва лимфоцитов	5(31,3)	5(31,3)	0	3(23,1)	3(23,1)	0
Заложенность носа	5(31,3)	0	0	0	0	0
Лихорадка	5(31,3)	0	0	9 (69,2)	1 (7,7)	0
Кашель	4 (25,0)	0	0	4 (30,8)	0	0
Периферический отек	4 (25,0)	0	0	4 (30,8)	0	0
Зуд	4 (25,0)	0	0	4 (30,8)	0	0

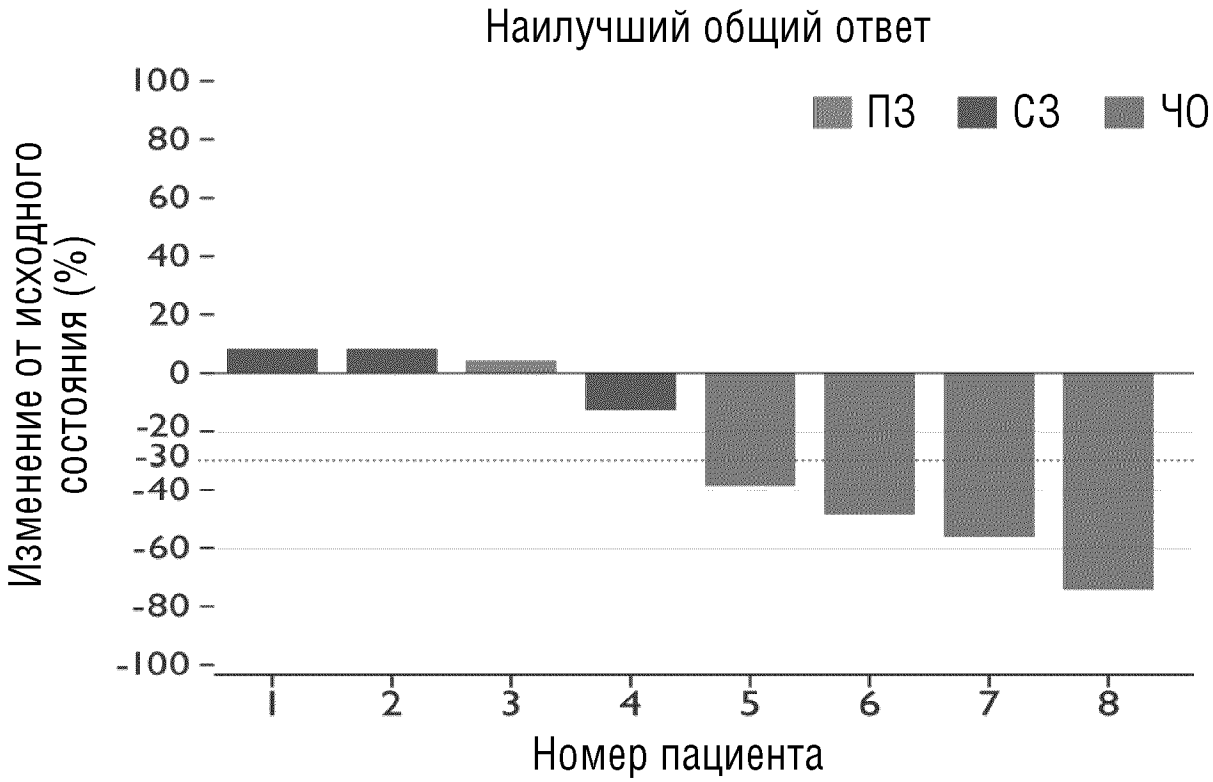
Примечание: Неблагоприятные явления кодированы по MedDRA версии 18.1

Для пациентов, имеющих множество событий для конкретного предпочтительного термина, засчитывают только один раз, используя максимальную степень для каждого предпочтительного термина

События сортированы по уменьшающейся частоте предпочтительного термина для СОК в каждой категории

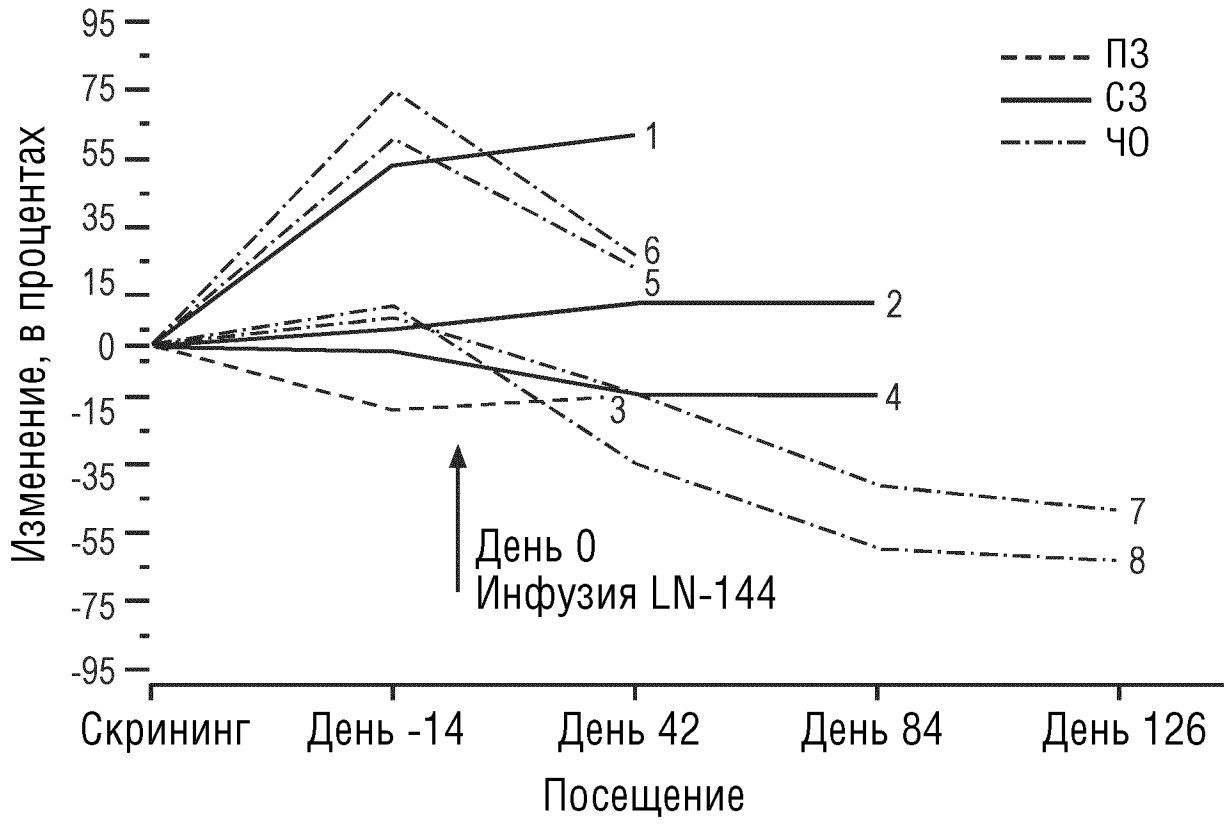
Нежелательными явлениями, возникающими в ходе лечения, называют любые НЯ, возникающие во время, или после, даты введения первой дозы предварительной химиотерапии (флударабин и циклофосфамид) вплоть до даты введения последней дозы IL2 + 30 дней

ФИГ.111

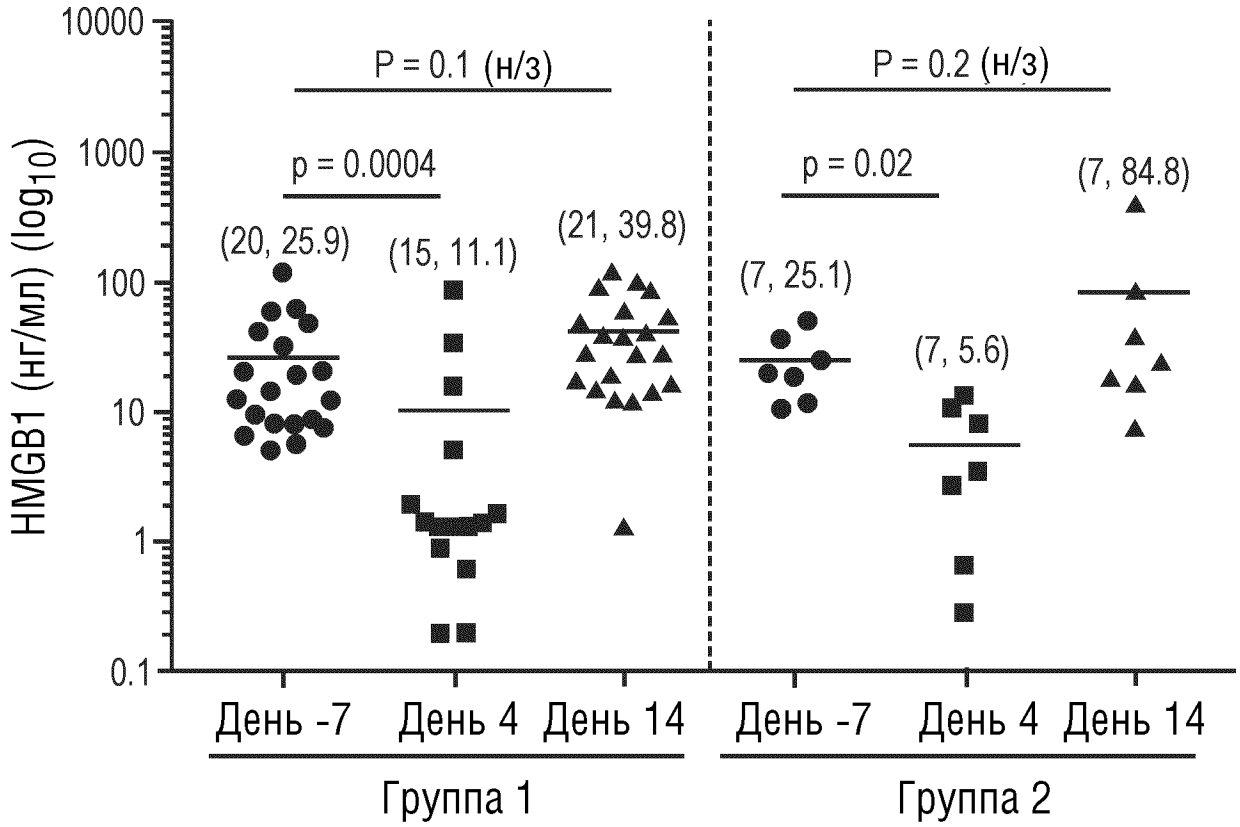


ФИГ.112

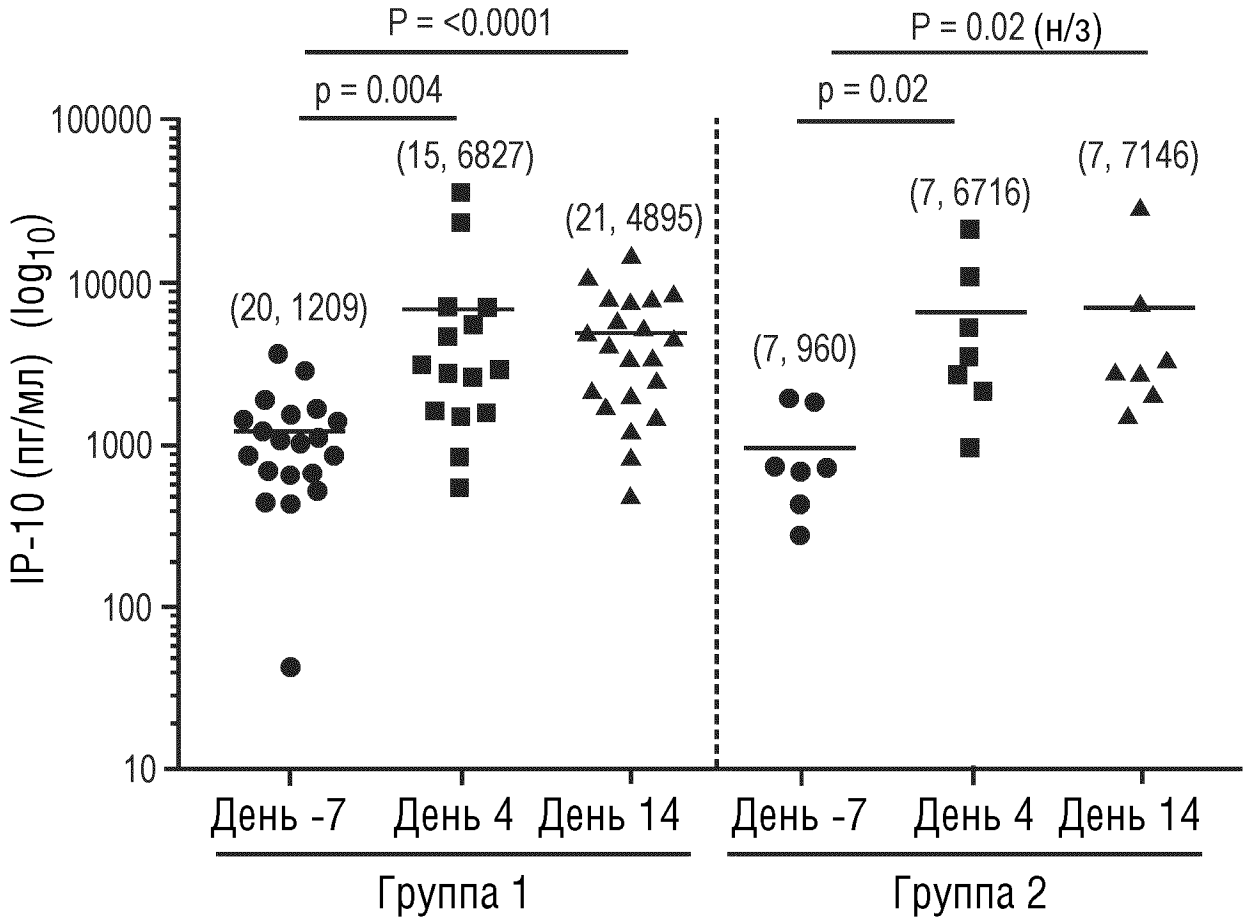
ФИГ.113


95
75
55
35
15
0
-15
-35
-55
-75
-95
Изменение, в процентах
ПЗ
СЗ
ЧО
1
2
3
4
5
6
7
8
День 0
Инфузия LN-144
Скрининг
День -14
День 42
День 84
День 126
Посещение

ФИГ.114


10000
1000
100
10
1
0.1
HMGB1 (нг/мл) (log10)
P = 0.1 (н/з)
p = 0.0004
(20, 25.9)
(15, 11.1)
(21, 39.8)
P = 0.2 (н/з)
p = 0.02
(7, 25.1)
(7, 5.6)
(7, 84.8)
День -7
День 4
День 14
День -7
День 4
День 14
Группа 1
Группа 2

ФИГ.115


P = <0.0001
p = 0.004
P = 0.02 (н/з)
p = 0.02
100000
10000
1000
100
10
IP-10 (пг/мл) (log10)
(20, 1209)
(15, 6827)
(21, 4895)
(7, 960)
(7, 6716)
(7, 7146)
День -7
День 4
День 14
День -7
День 4
День 14
Группа 1
Группа 2

ФИГ.116

ХАРАКТЕРИСТИКИ	Группа 2 N = 17 (%)
Пол, n (ц%)	
Мужчины	8(47)
Женщины	9(53)
Возраст	
Средний	54
Мин, Макс	35, 66
Предыдущее лечение, n (%)	
Среднее количество предшествующих системных видов лечения	3,6
Анти-CTLA-4	15 (88)
Анти-PD-1	16 (94)
Сумма диаметров целевой лезии (мм)	
Среднее (SD)	140 (93)
Мин, Макс	38, 342

ХАРАКТЕРИСТИКИ	Группа 2 N = 17 (%)
Исходный показатель ECOG, n (%)	
0	11(65)
1	6(35)
Статус BRAF, n (%)	
Мутантный	5(29)
Дикого типа	9(53)
Неизвестно	3(18)
Исходный показатель LDH (Ед/л [SD])	
1-2-кратный ВПН	8(47)
>2-кратного ВПН	2(12)
Количество целевых и не целевых лезий (в начале исследования)	
>3	12(71)
Среднее	5,9

В Группе 2:

В среднем 3,6 предыдущих курсов лечения

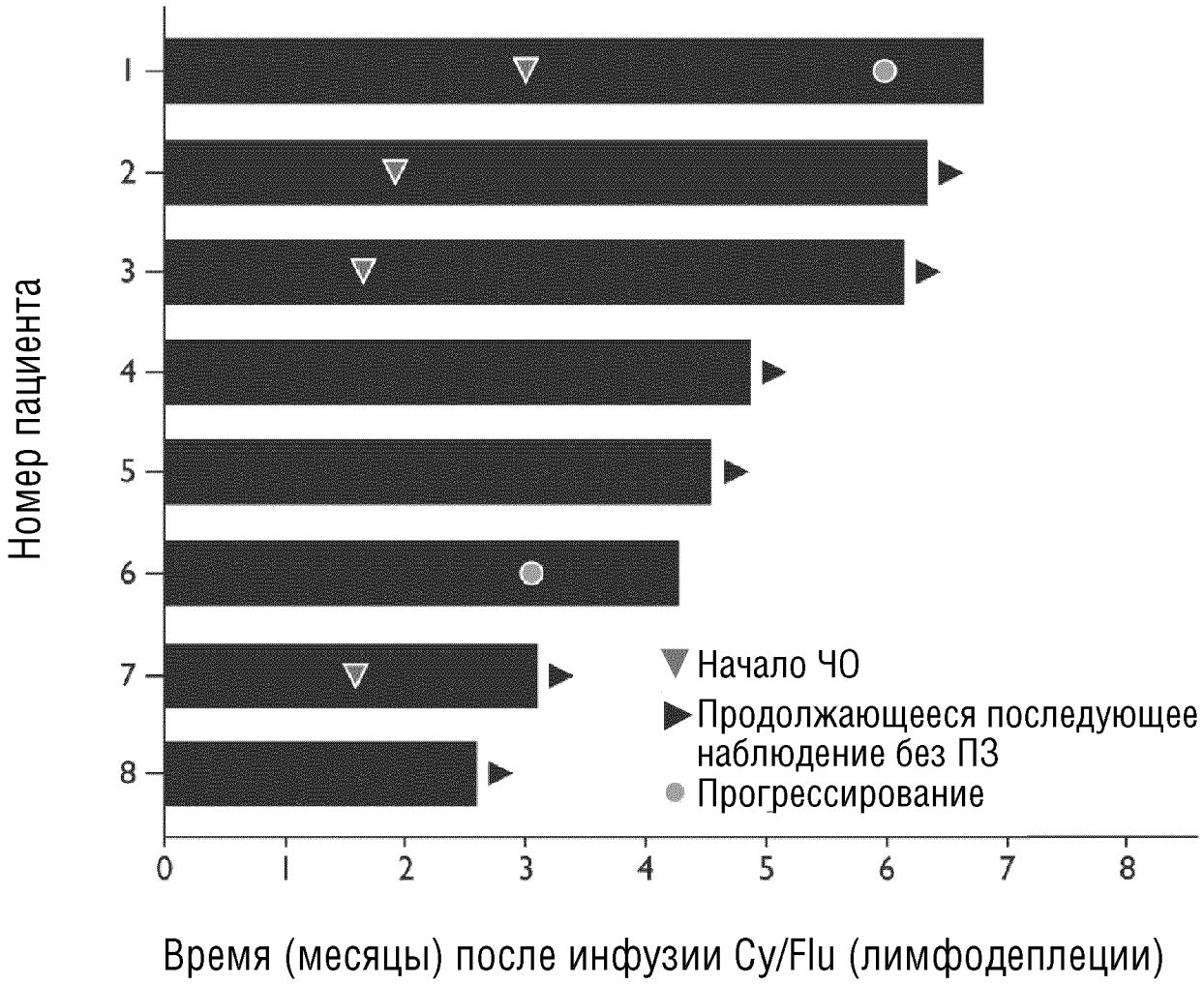
Высокая опухолевая нагрузка в начале исследования, о чем свидетельствует сумма диаметров целевых лезий 140 мм

ФИГ.117

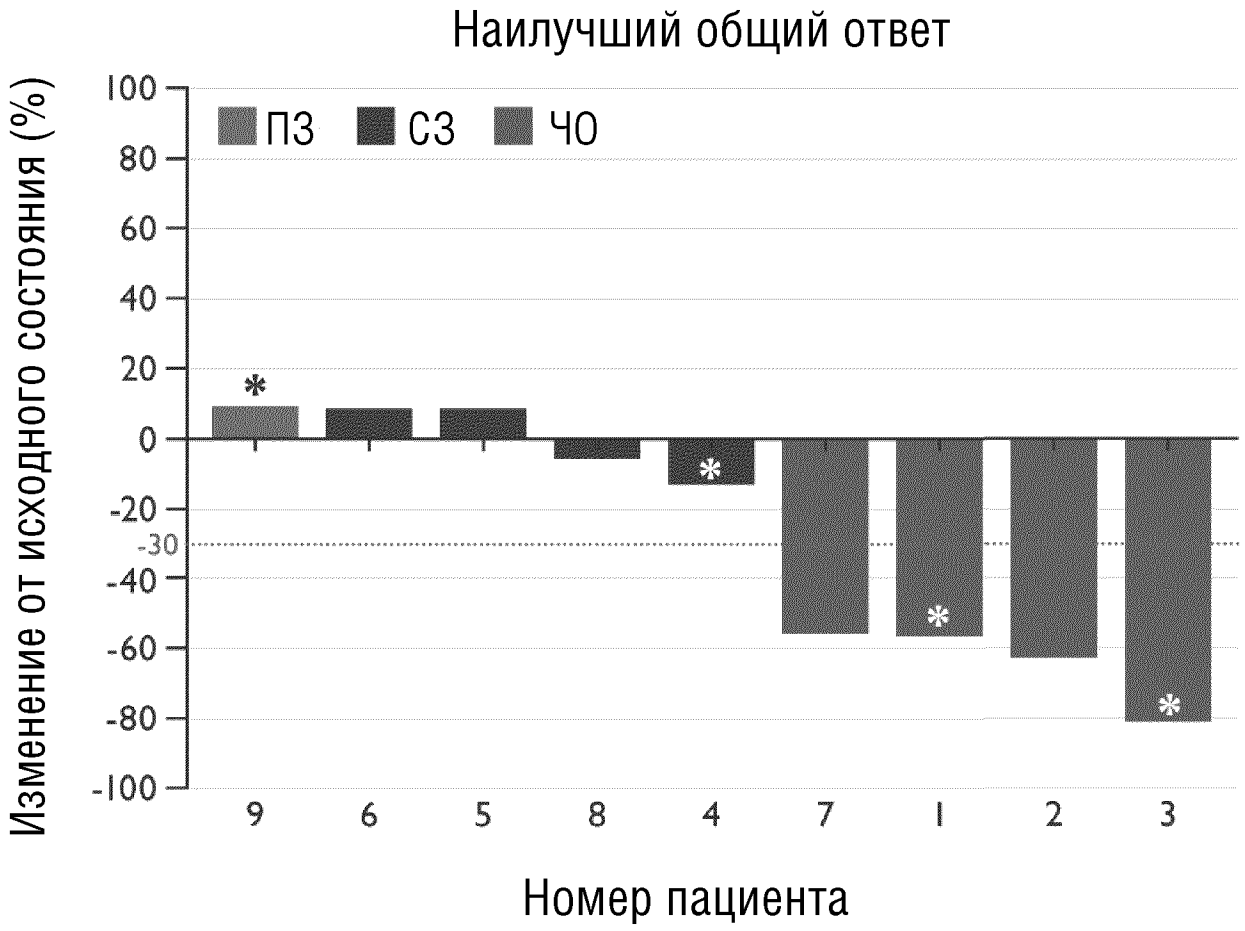
ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЙ ТЕРМИН	Группа 2 (N =17)		
	Любая степень n (%)	Степень 3/4 n (%)	Степень 5 n (%)
Количество пациентов, сообщивших о по меньшей мере одном возникшим в ходе лечения НЯ	16(94,1)	16(94,1)	0
Лихорадка	13(76,5)	1 (5,9)	0
Анемия	11 (64,7)	10(58,8)	0
Уменьшение количества нейтрофилов	10(58,8)	10(58,8)	0
Уменьшение количества тромбоцитов	10(58,8)	8(47,1)	0
Фебрильная нейтропения	10(58,8)	8(47,1)	0
Усталость	10(58,8)	0	0
Озноб	9 (52,9)	1 (5,9)	0
Тошнота	9 (52,9)	0	0
Уменьшение количества лейкоцитов	8(47,1)	8(47,1)	0
Уменьшение количества лимфоцитов	6 (35,3)	6 (35,3)	0
Диарея	6 (35,3)	0	0
Снижение аппетита	6 (35,3)	0	0

Примечание: для пациентов, имеющих множество событий для конкретного предпочтительного термина, засчитывают только один раз, используя максимальную степень для каждого предпочтительного термина. Нежелательными явлениями, возникающими в ходе лечения, называют любые НЯ, возникающие во время, или после, даты введения первой дозы предварительной химиотерапии (флударабин и циклофосфамид) вплоть до даты введения последней дозы IL2 + 30 дней

ФИГ.118


Номер пациента
1
2
3
4
5
6
7
8
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Начало ЧО
Продолжающееся последующее наблюдение без ПЗ
Прогрессирование
Время (месяцы) после инфузии Cy/Flu (лимфодеплеции)

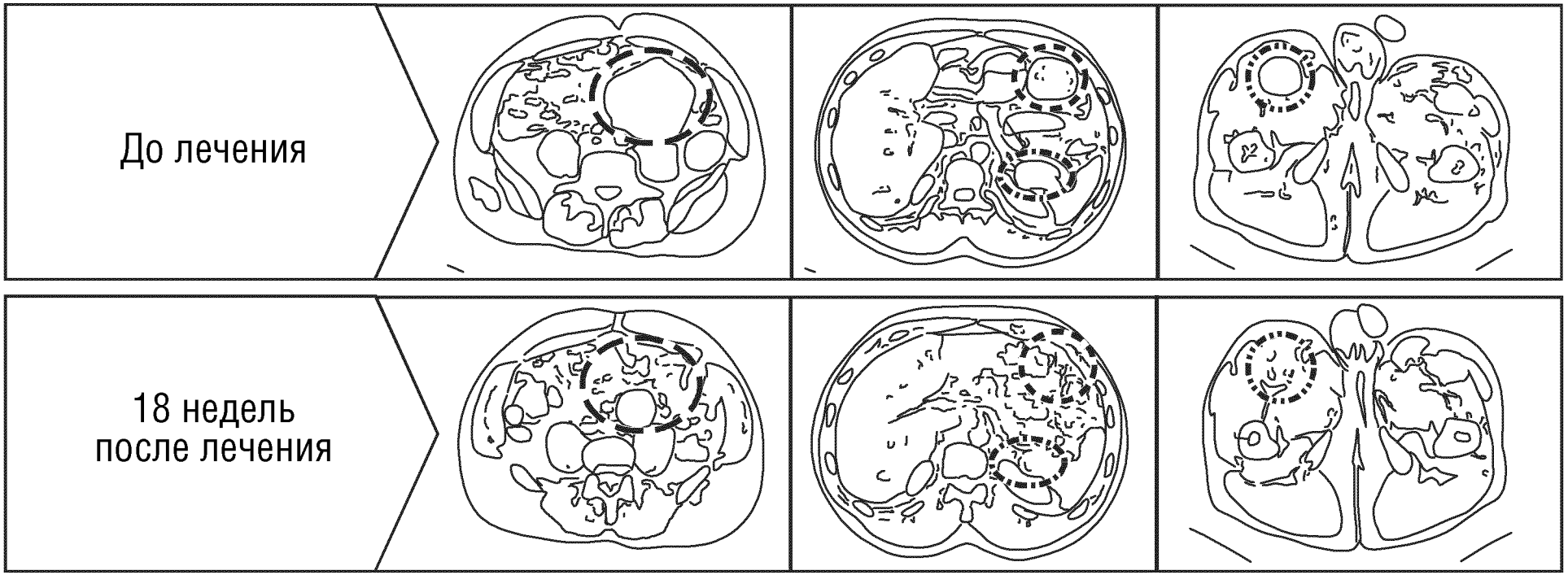
ФИГ.119


Наилучший общий ответ
ПЗ
СЗ
ЧО
Изменение от исходного состояния (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-30
-40
-60
-80
-100
9
6
5
8
4
7
1
2
3
Номер пациента

ФИГ.120

ОТВЕТ	ПАЦИЕНТЫ, N=10 n (%)
Частота объективного ответа	**4 (40%)**
Частота контроля заболевания	8 (80%)
Частичный ответ	4 (40%)
Стабильное заболевание	4 (40%)
Прогрессирующее заболевание	1 (10%)
Не поддается оценке*	1 (10%)

ФИГ.121



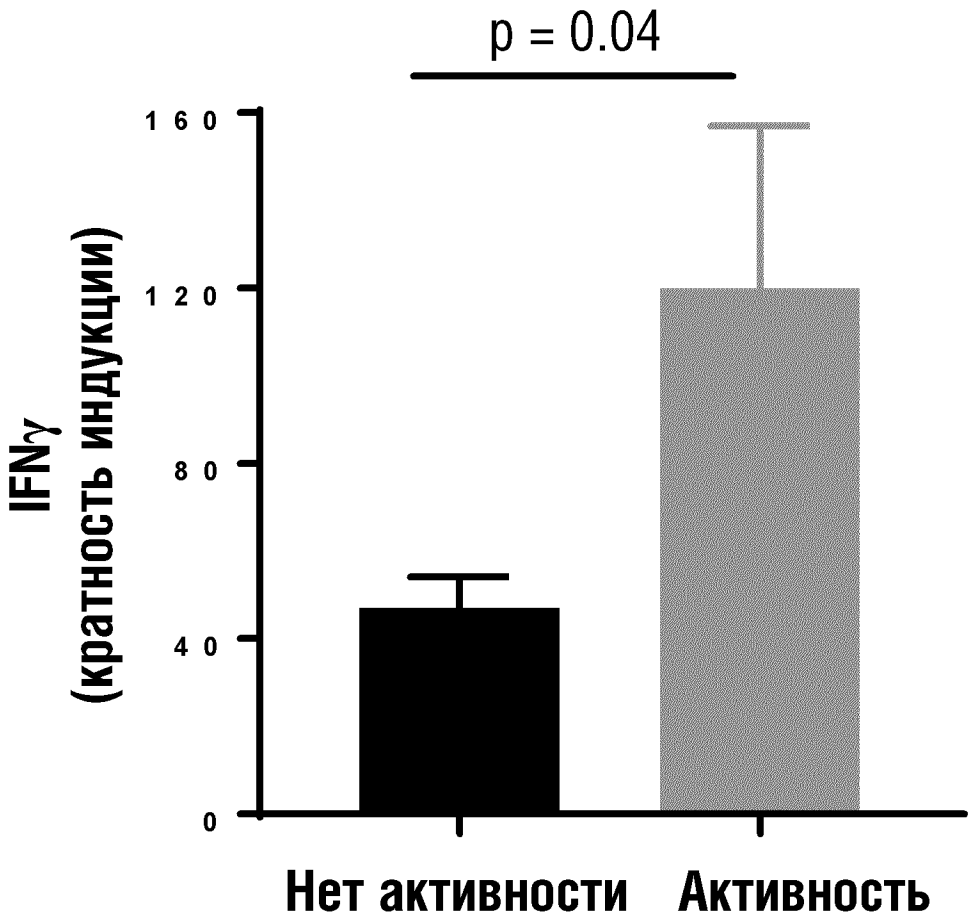
ЛО1: Левый нижний квадрант живота - Исх.: 8,8 см/18 недель: 3,7 см

ЛО2: Левый верхний квадрант живота - Исх.: 5,2 см/18 недель: 0 см

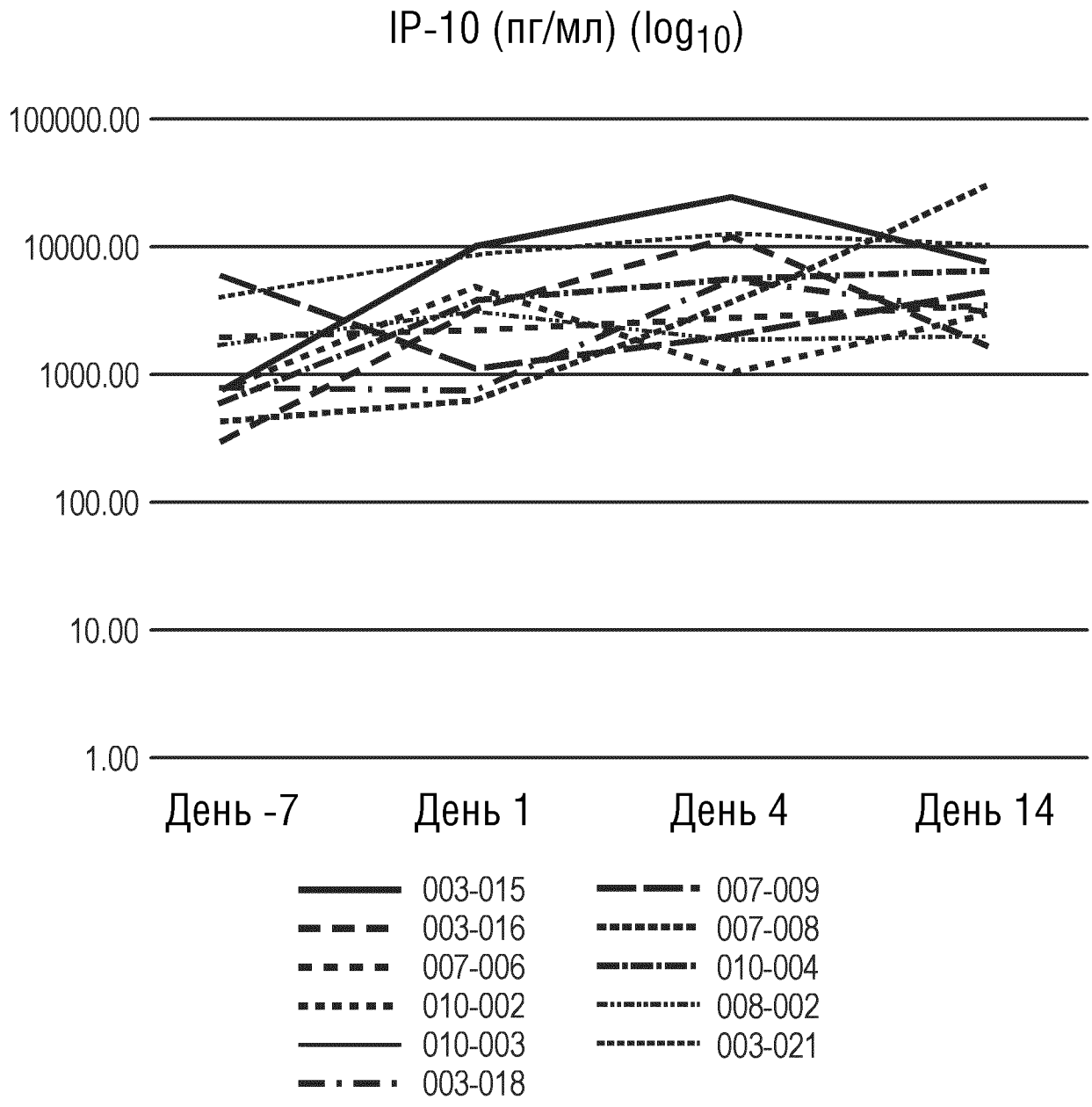
ЛО3: Левая почка – Исх.: 4,1 см/18 недель: 2,1 см

ЛО5: Правый бедренный лимфоузел - 4 см (короткая ось)/ 18 недель: 2,3 см

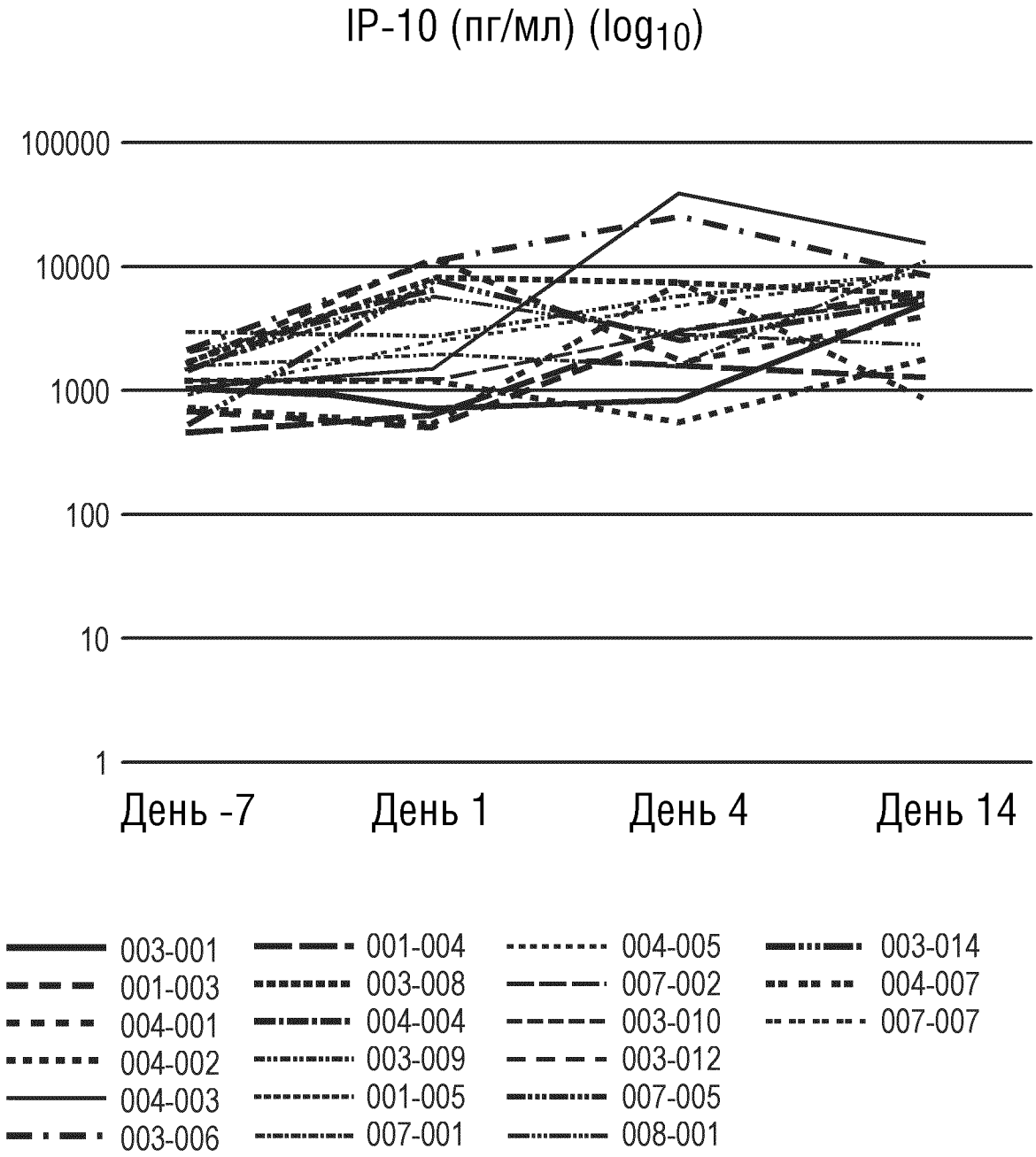
ФИГ.122


p = 0.04
160
120
80
40
0
IFNγ
(кратность индукции)
Нет активности
Активность

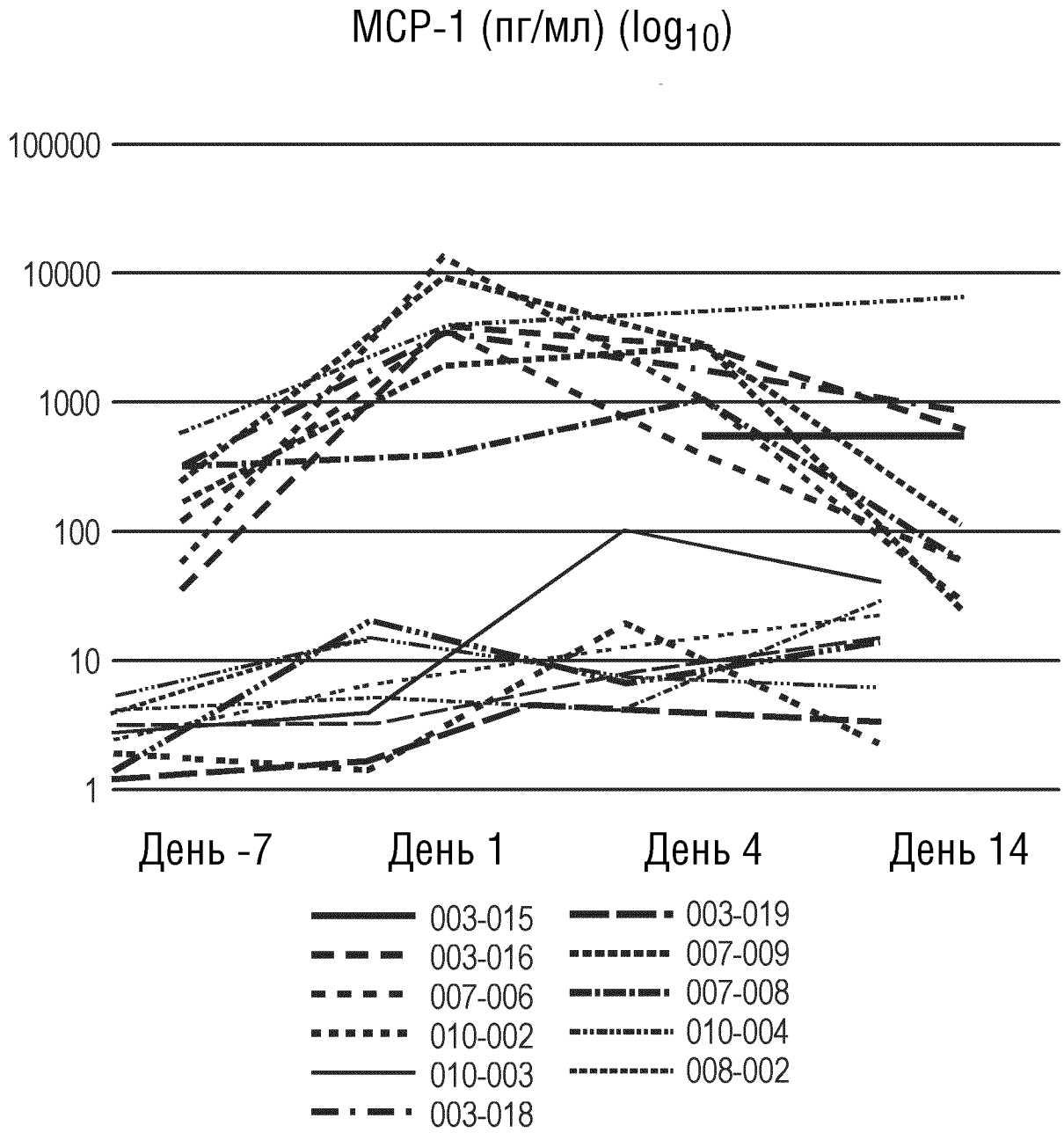
ФИГ.123


IP-10 (пг/мл) (log_{10})
100000.00
10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
День -7
День 1
День 4
День 14
003-015
003-016
007-006
010-002
010-003
003-018
007-009
007-008
010-004
008-002
003-021

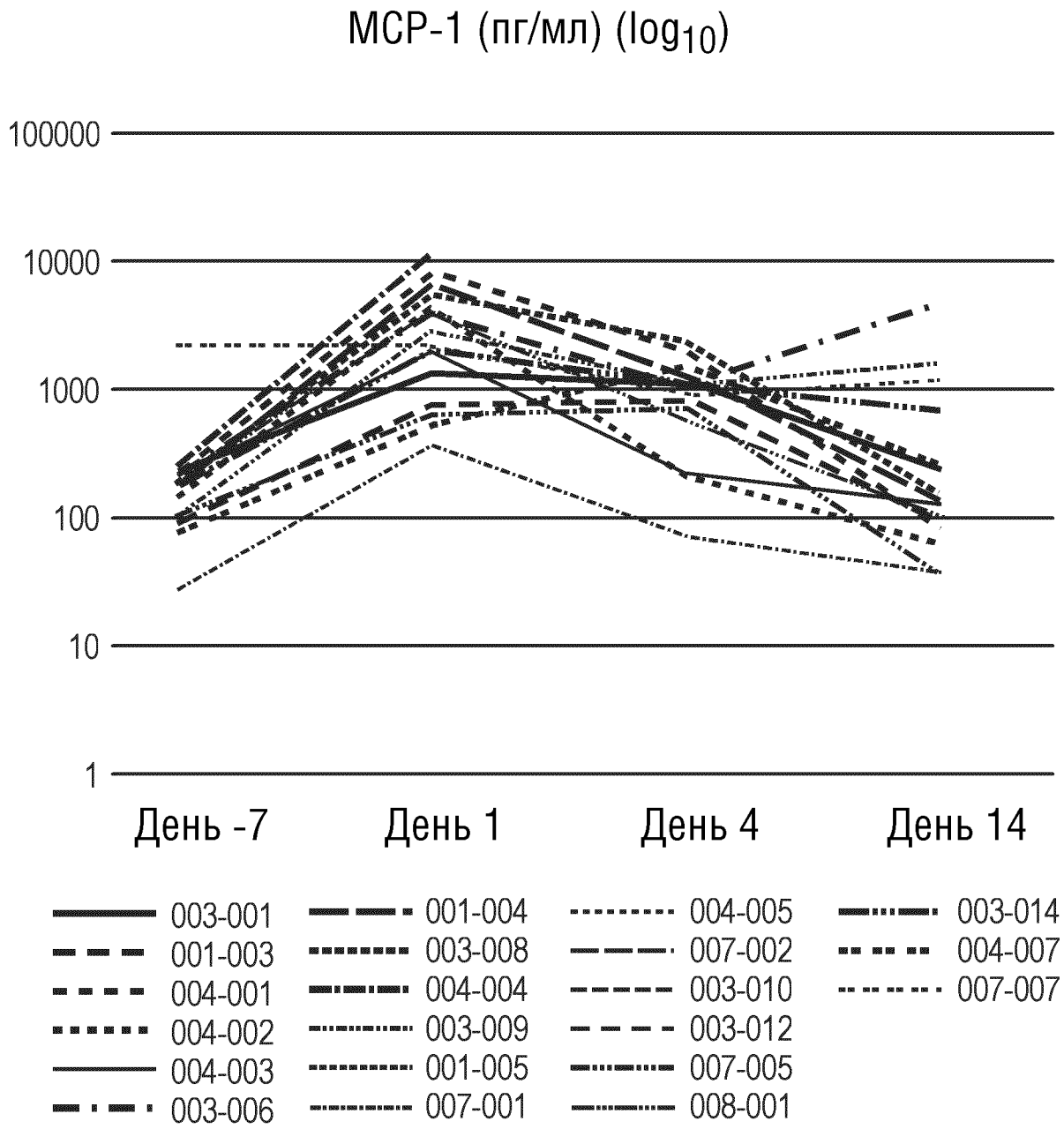
ФИГ.124


IP-10 (пг/мл) (log_{10})
100000
10000
1000
100
10
1
День -7
День 1
День 4
День 14
003-001
001-003
004-001
004-002
004-003
003-006
001-004
003-008
004-004
003-009
001-005
007-001
004-005
007-002
003-010
003-012
007-005
008-001
003-014
004-007
007-007

ФИГ.125


MCP-1 (пг/мл) (log_{10})
100000
10000
1000
100
10
1
День -7
День 1
День 4
День 14
003-015
003-016
007-006
010-002
010-003
003-018
003-019
007-009
007-008
010-004
008-002

ФИГ.126


MCP-1 (пг/мл) (log_{10})
100000
10000
1000
100
10
1
День -7
День 1
День 4
День 14
003-001
001-003
004-001
004-002
004-003
003-006
001-004
003-008
004-004
003-009
001-005
007-001
004-005
007-002
003-010
003-012
007-005
008-001
003-014
004-007
007-007

ФИГ.127

Карцинома шейки матки (C-145-04)

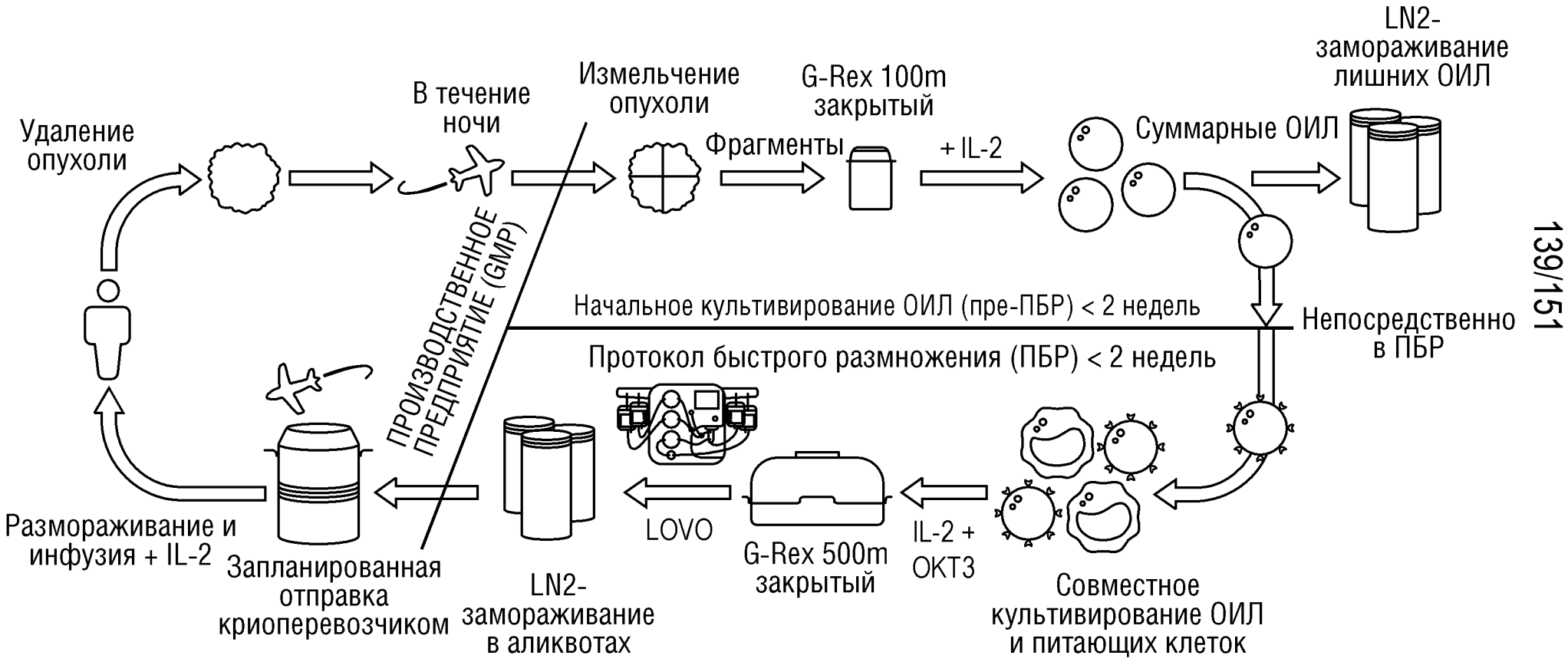
ПАЦИЕНТ №	ИНФУЗИЯ	КОЛ-ВО ВВЕДЕННЫХ ИНФУЗИЕЙ КЛЕТОК	ОТВЕТ В ДЕНЬ 42	ОТВЕТ В ДЕНЬ 84	ОТВЕТ В ДЕНЬ 126	ОТВЕТ ЧЕРЕЗ 6 МЕСЯЦЕВ	ОТВЕТ ЧЕРЕЗ 9 МЕСЯЦЕВ	НОО
1	9-авг-17	32,6 млрд	ЧО	ЧО	-	-	-	-
2	19-сен-17	41,4 млрд	СЗ (требуется подтверждение)	-	-	-	-	-

ПКГШ (C-145-03)

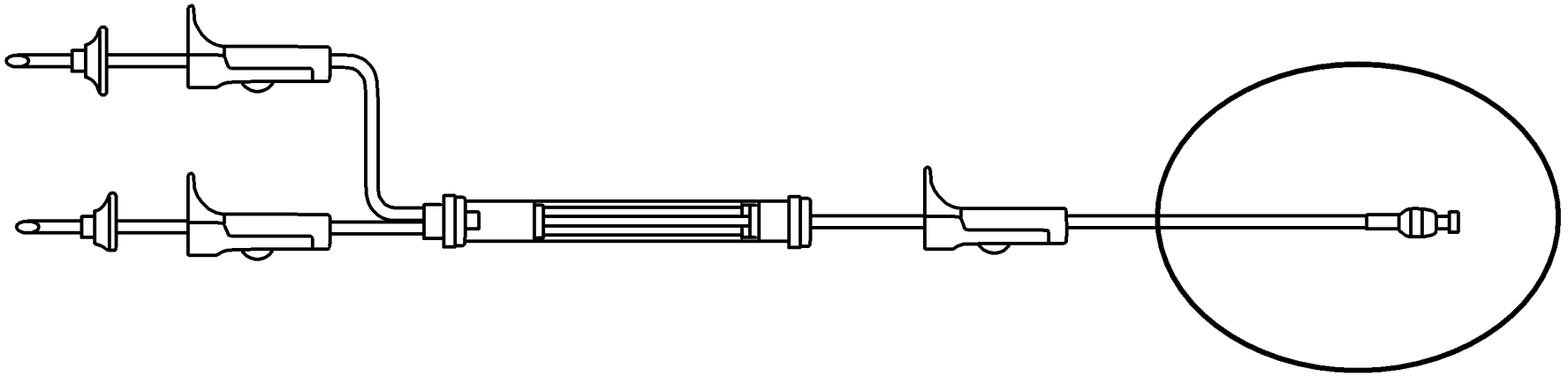
ПАЦИЕНТ №	ИНФУЗИЯ	КОЛ-ВО ВВЕДЕННЫХ ИНФУЗИЕЙ КЛЕТОК	ОТВЕТ В ДЕНЬ 28	ОТВЕТ В ДЕНЬ 56	ОТВЕТ В ДЕНЬ 84	ОТВЕТ ЧЕРЕЗ 4 МЕСЯЦА	ОТВЕТ ЧЕРЕЗ 6 МЕСЯЦЕВ	НОО
1	31-мая-17	21 млрд	СЗ	ПЗ	Прекращено	-	-	СЗ
2	20-июн-17	21 млрд	ЧО	СЗ	СЗ	Скончался	-	СЗ
3	1-авг-17	30 млрд	ЧО	ЧО	ЧО	ПЗ	-	ЧО
4	14-сен-17	65 млрд	ЧО	ЧО	-	-	-	ЧО
5	03-ноя-17	10 млрд	-	-	-	-	-	-
6	07-ноя-17	37 млрд	-	-	-	-	-	-
7	08-ноя-17	21,5 млрд	-	-	-	-	-	-

Среднее количество предшествующих курсов лечения для ПКГШ: 4, все имели плохой результат анти-PD-1.
Данные являются текущими и могут быть изменены.

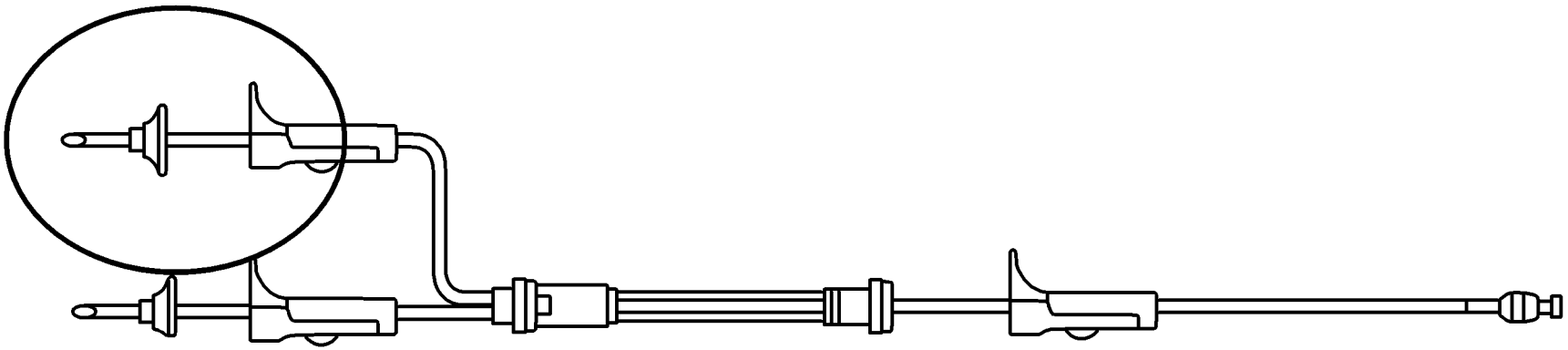
ФИГ.128


Удаление опухоли
В течение ночи
Измельчение опухоли
G-Rex 100m закрытый
Фрагменты
+ IL-2
Суммарные ОИЛ
LN2-замораживание лишних ОИЛ
ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ (GMP)
Начальное культивирование ОИЛ (пре-ПБР) < 2 недель
Непосредственно в ПБР
Протокол быстрого размножения (ПБР) < 2 недель
Размораживание и инфузия + IL-2
Запланированная отправка криоперевозчиком
LN2-замораживание в аликвотах
LOVO
G-Rex 500m закрытый
IL-2 + OKT3
Совместное культивирование ОИЛ и питающих клеток

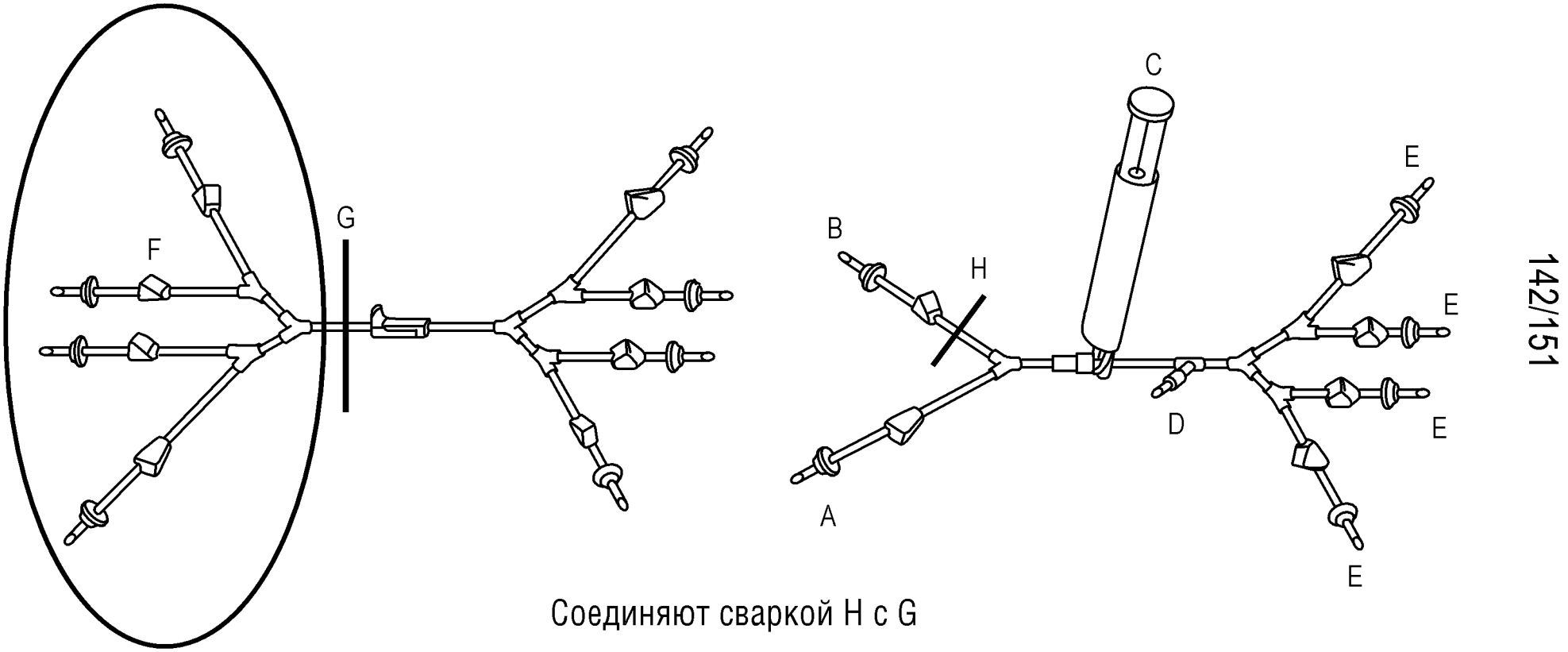
ФИГ.129



ФИГ.130

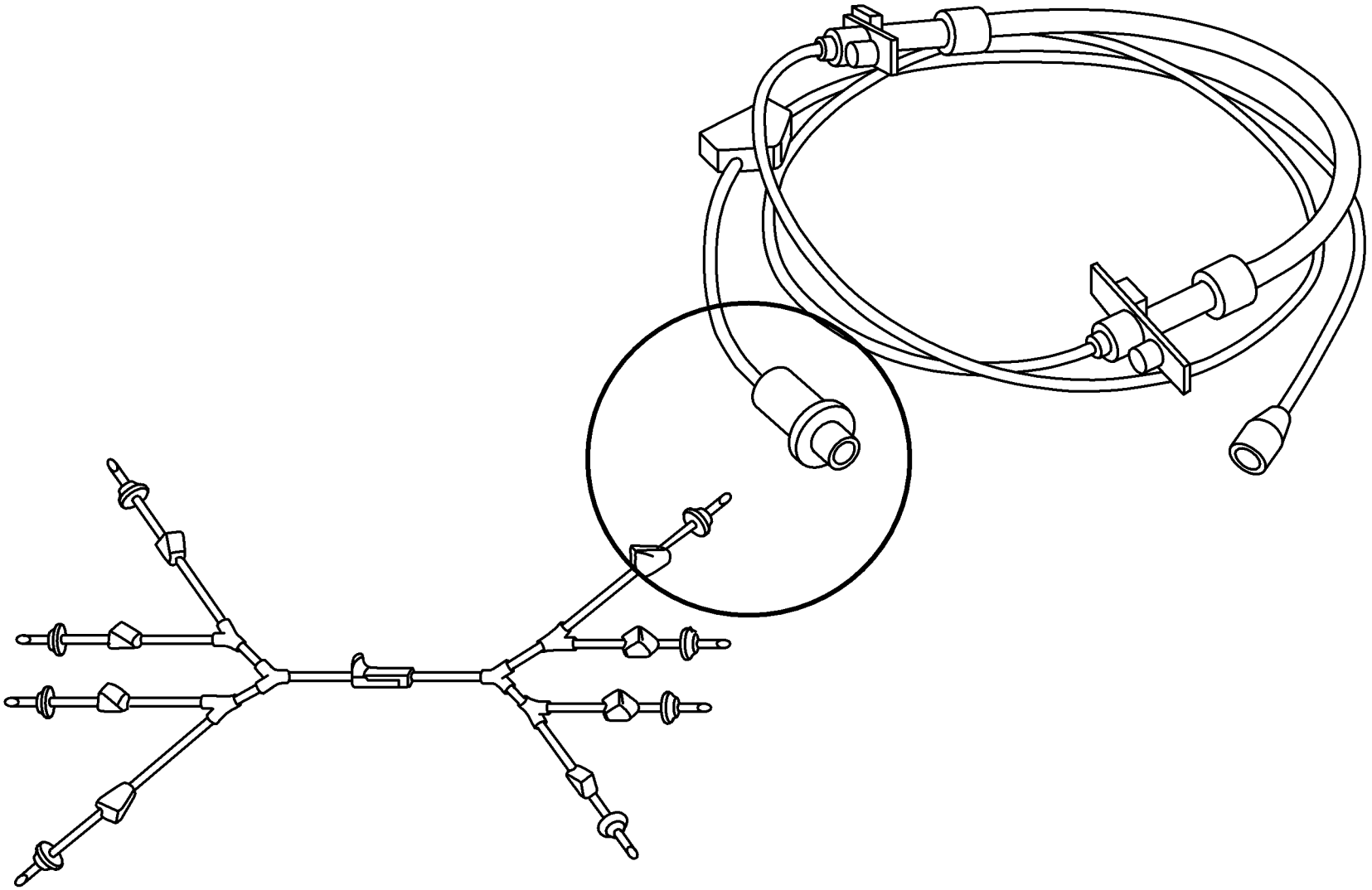


ФИГ.131

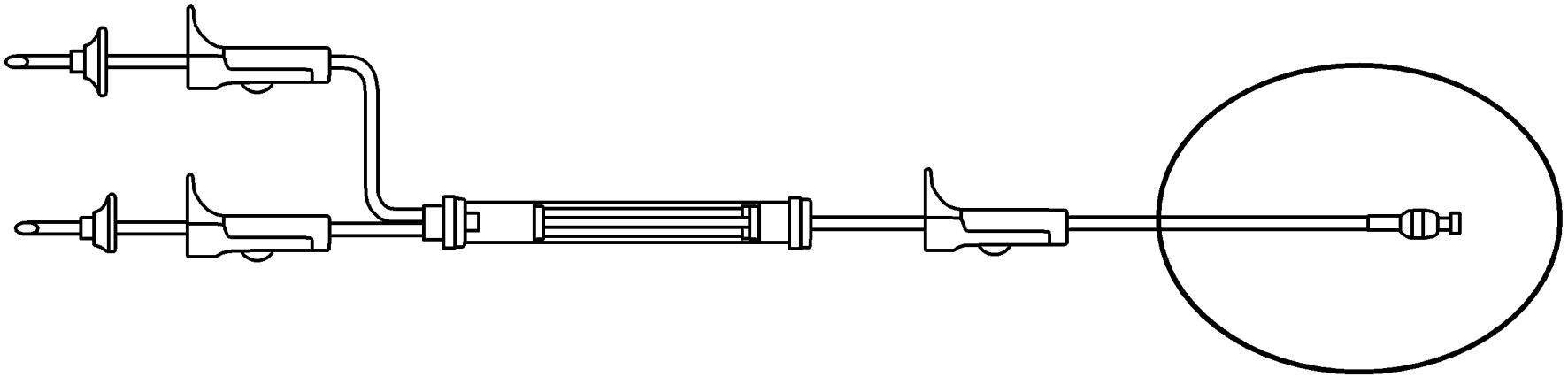


Соединяют сваркой H с G

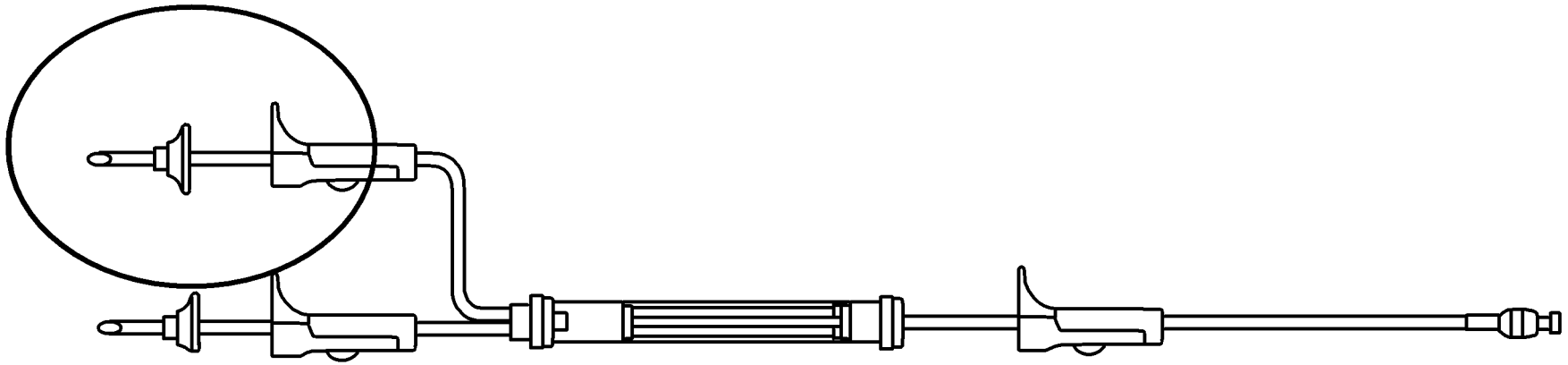
ФИГ.132



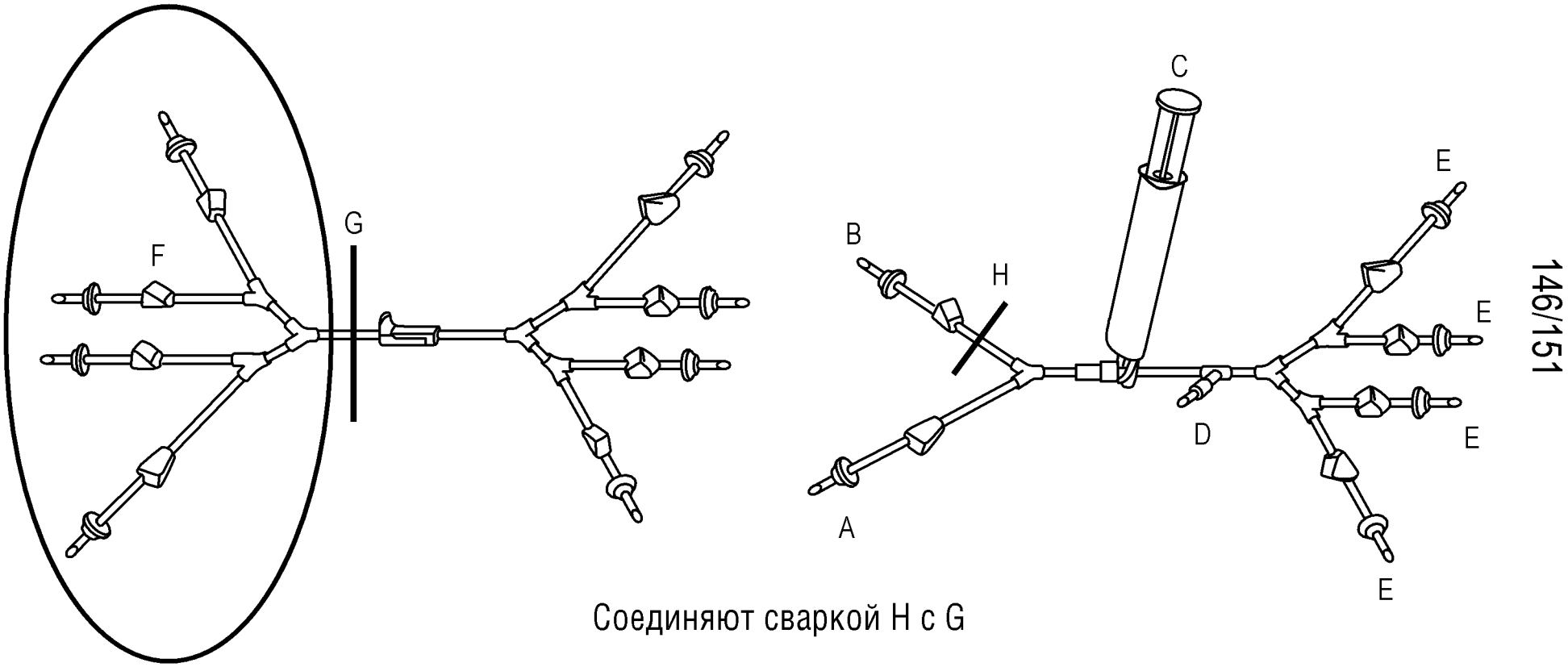
ФИГ.133



ФИГ.134

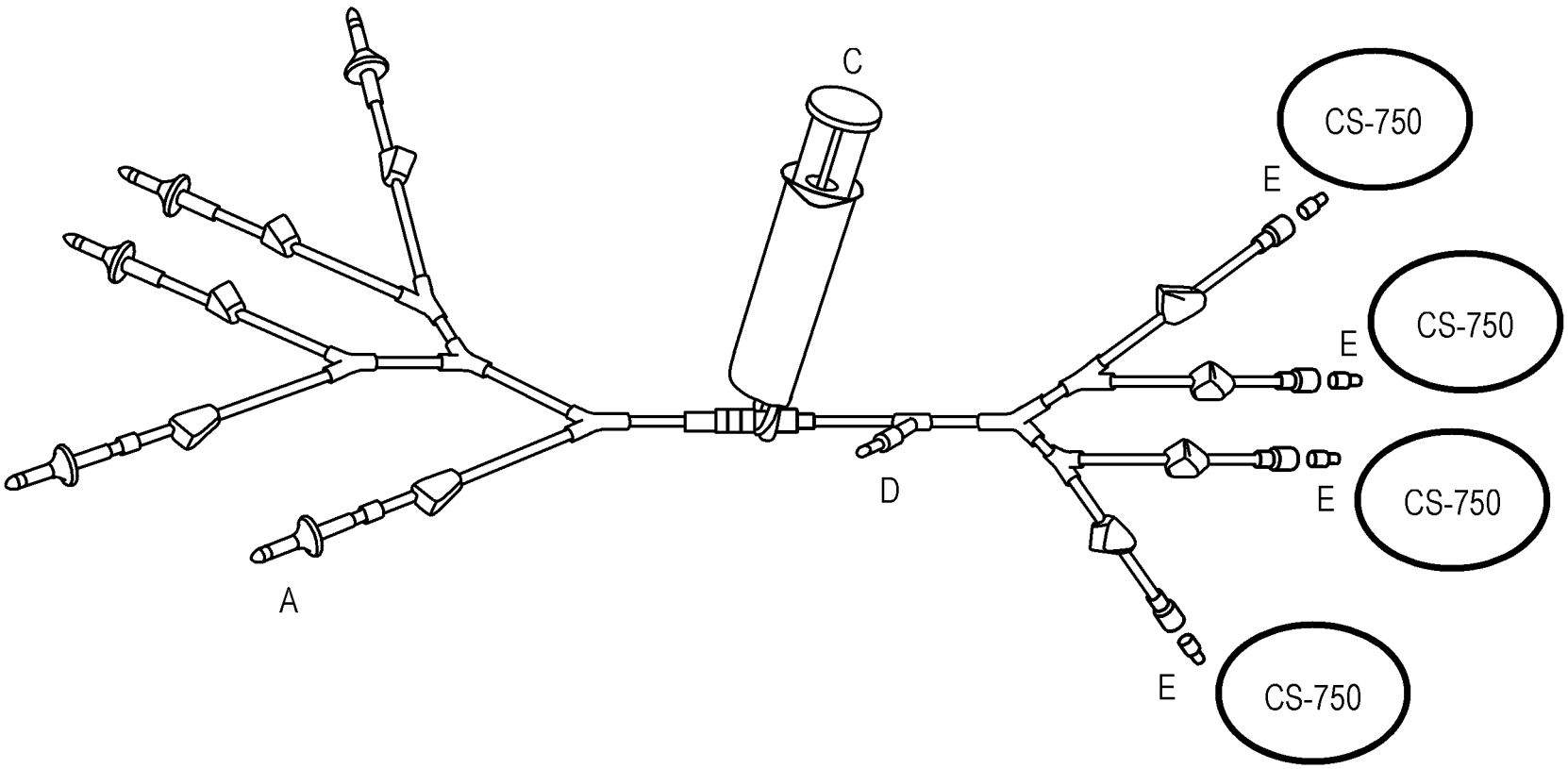


ФИГ.135

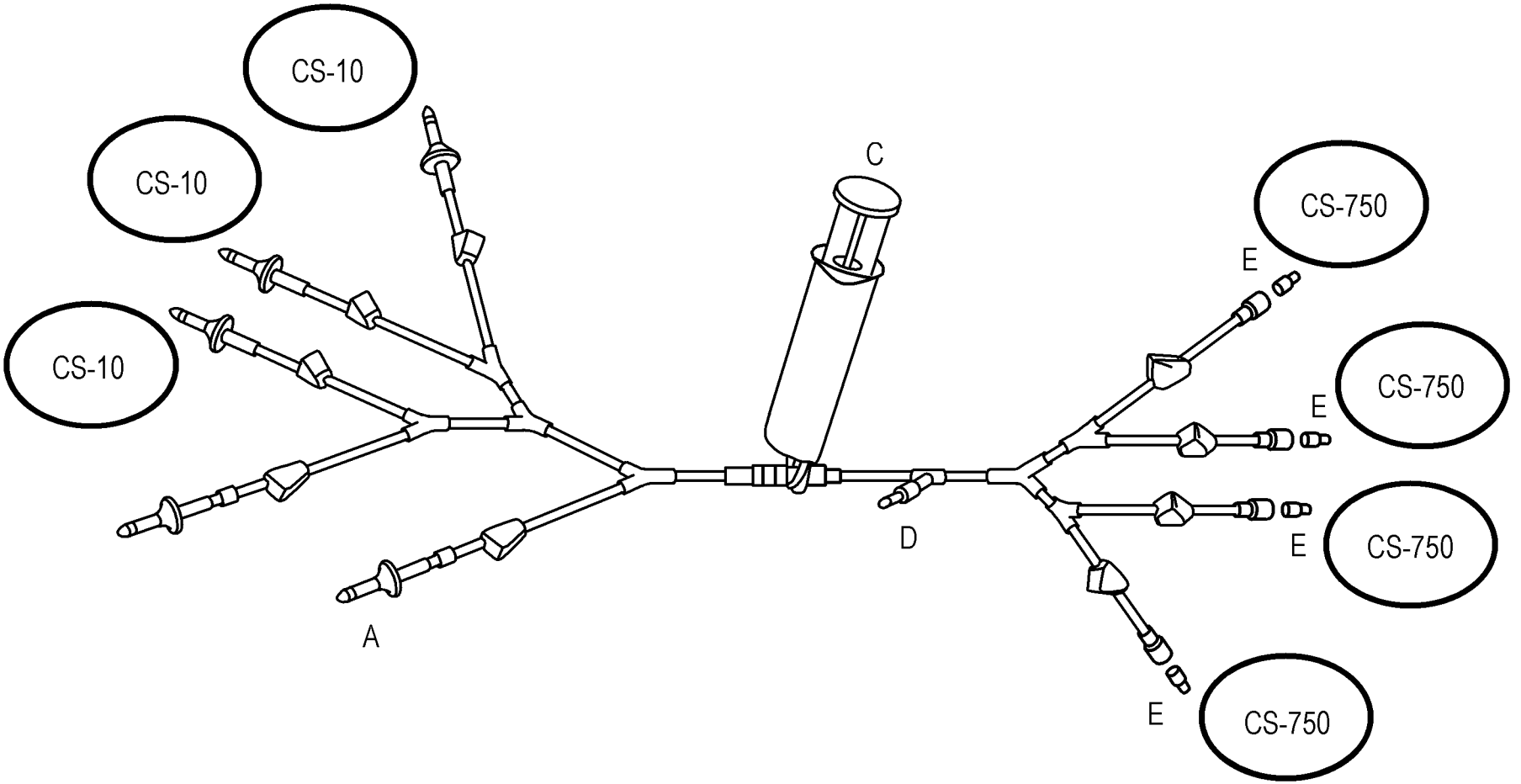


Соединяют сваркой H с G

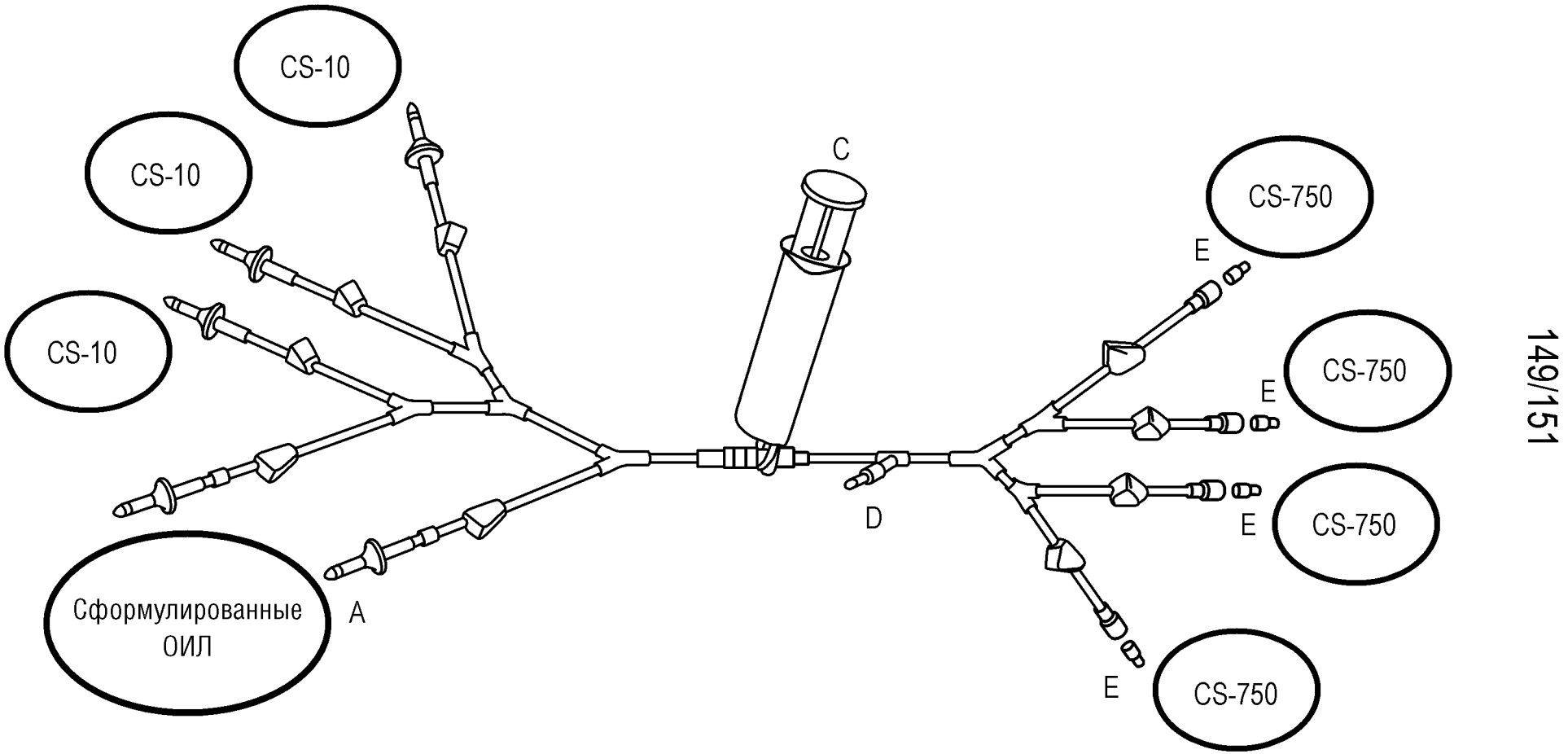
ФИГ.136



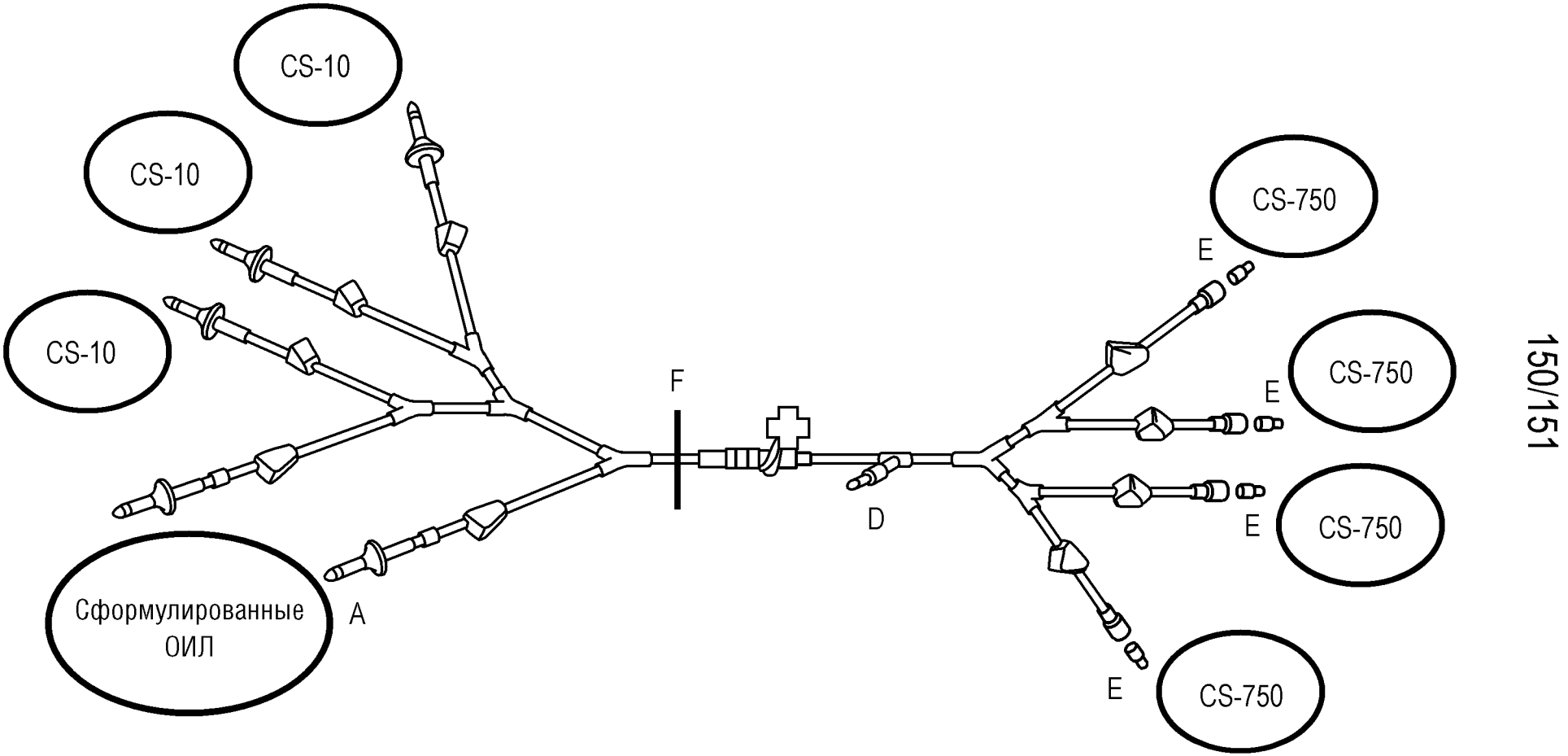
ФИГ.137



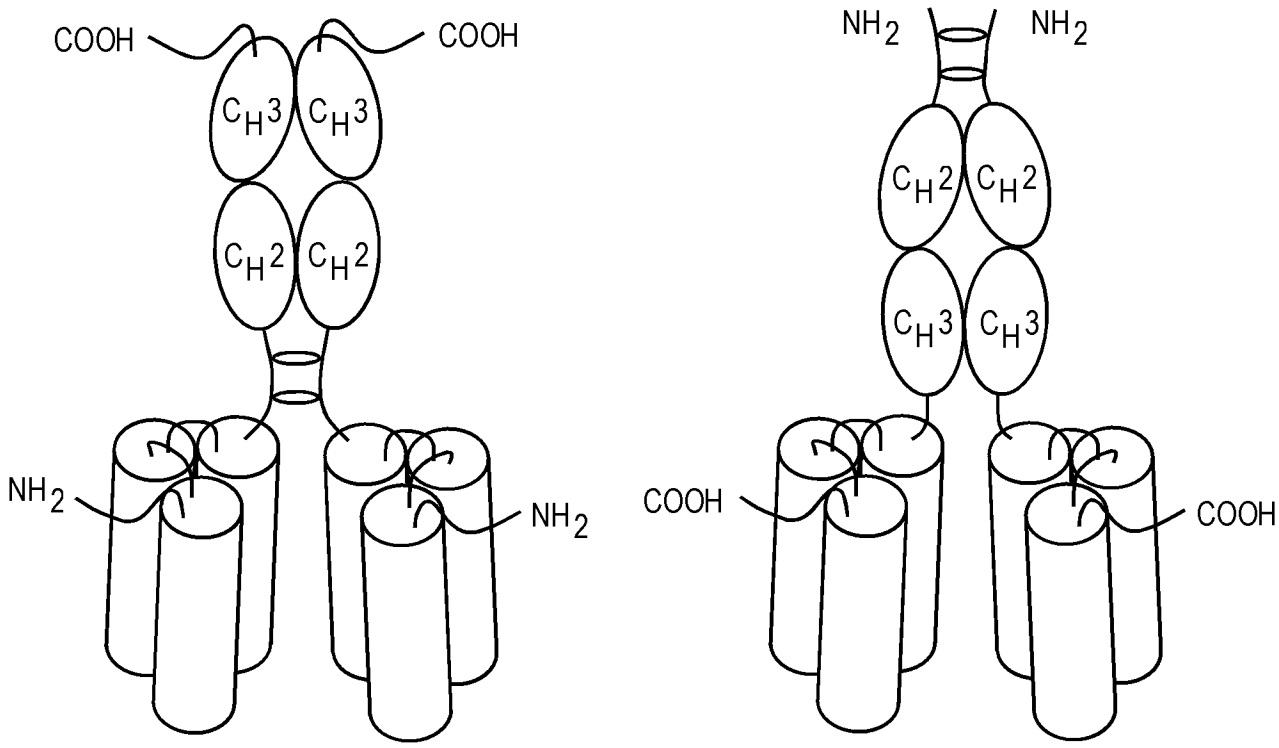
ФИГ.138


CS-10
CS-10
CS-10
Сформулированные ОИЛ
A
C
D
CS-750
E
CS-750
E
CS-750
E
CS-750
E

ФИГ.139


CS-10
CS-10
CS-10
Сформулированные ОИЛ
A
F
D
E
CS-750
E
CS-750
E
CS-750
E
CS-750

ФИГ.140



Структура I-A

Структура I-B

ФИГ.141