

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092503 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.03.16

(51) Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 5/09 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.04.26

(54) ЗАМКНУТЫЙ СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА
ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В
ИММУНОТЕРАПИИ

(31) 62/663,885; 62/680,821

(32) 2018.04.27; 2018.06.05

(33) US

(86) PCT/US2019/029286

(87) WO 2019/210131 2019.10.31

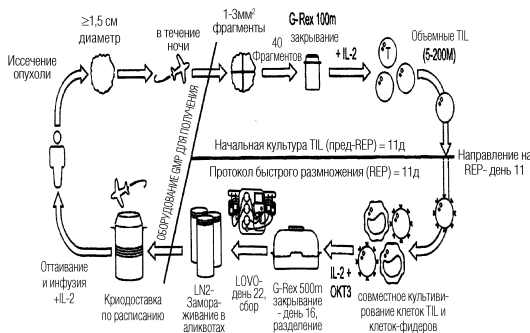
(71) Заявитель:
АЙОВЭНС БАЙОТЕРАПЬЮТИКС,
ИНК. (US)

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

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

(57) Настоящее изобретение предлагает улучшенные и/или сокращенные способы размножения TIL и получение терапевтических популяций TIL, включающие новые способы размножения популяций TIL в замкнутой системе, которые приводят к улучшению эффективности, улучшению фенотипа и повышению метаболического здоровья TIL за более короткий период времени, при этом делая возможным уменьшение микробного загрязнения, а также снижение затрат. Способы могут включать редактирование генома по меньшей мере части TIL для повышения их терапевтической эффективности. Такие TIL находят применения в режимах терапевтического лечения.

Процесс 2A - 22-дневный процесс, 2-3 дня, сбор/перенос



A1

202092503

202092503

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565088EA/011

ЗАМКНУТЫЙ СПОСОБ РАЗМНОЖЕНИЯ И РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИММУНОТЕРАПИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] В настоящем документе описываются способы размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) и получение терапевтических популяций TIL. в дополнение к этому, в настоящем документе описываются способы редактирования генома TIL и использование TIL с отредактированным геномом при лечении заболеваний, таких как рак.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Лечение объемных, не поддающихся лечению раковых заболеваний с использованием adoptивного переноса инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) представляет собой мощный подход к терапии для пациентов с плохими прогнозами. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 383-393. Для успешной иммунотерапии требуется большое количество TIL, а для коммерциализации требуются устойчивый и надежный способ. Достижение этого является проблемой из-за технических, логистических и административных проблем с размножением клеток. Размножение TIL на основе L-2 с последующим “быстрым процессом размножения” (REP) стало предпочтительным способом размножения TIL благодаря своей скорости и эффективности. Dudley, *et al.*, *Science* 2002, 298, 850-54; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-57; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-39; Riddell, *et al.*, *Science* 1992, 257, 238-41; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42. REP может давать в результате к 1000-кратное размножение TIL в течение 14-дневного периода, хотя он требует большего избытка (*например*, 200-кратного) облученных, аллогенных мононуклеаров периферической крови (PBMC, также известные как мононуклеарные клетки (MNC)), часто, от множества доноров, в качестве клеток-фидеров, а также антитело анти-CD3 (ОКТ3) и высоких доз IL-2. Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42. TIL, которые подвергаются воздействию процедуры REP, дают успешную adoptивную клеточную терапию после иммуноподавления у хозяина у пациентов с меланомой. Современные принятые параметры инфузии основываются на данных по композиции TIL (*например*, CD28-, CD8- или CD4-положительности) и на кратности размножения и жизнеспособности продукта REP.

[0003] Современные процессы получения TIL ограничиваются проблемами продолжительности, стоимости, стерильности и другими факторами, описанными в настоящем документе, так что потенциал коммерциализации таких процессов существенно ограничен, и по этим и другим причинам, в настоящее время нет доступных коммерческих процессов. Имеется срочная необходимость в создании процессов получения TIL и терапии на основе таких процессов, которые соответствуют производству в промышленном масштабе и одобрению административных органов в применениях на пациентах-людях во множестве клинических центров. Кроме того, имеется сильная необходимость в более

эффективной терапии ТП, которая может увеличить скорость реакции пациента и устойчивость его реакции.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Настоящее изобретение предлагает способы размножения ТП и получения терапевтической популяции ТП. Согласно иллюстративным вариантам осуществления, по меньшей мере, часть терапевтической популяции ТП имеет редактирование генома для усиления ее терапевтического воздействия.

[0005] В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение предлагает способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП, включающий:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней, для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству, чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (b) до стадии (c) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АПК), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней, для получения третьей популяции ТП, где третья популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (e) осуществляется без открывания системы;

(f) перенос собранной популяции ТП на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(g) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТП.

[0006] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает стадию криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТП, на Стадии (f), используя способ криоконсервирования.

[0007] В некоторых вариантах осуществления, способ криоконсервирования

осуществляется с использованием отношения собранной популяции ТП к среде криоконсервирования 1:1.

[0008] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки представляют собой моноклеары периферической крови (РВМС). В некоторых вариантах осуществления, РВМС являются облученными и аллогенными. В некоторых вариантах осуществления, РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9-14 на Стадии (d). В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки представляют собой искусственные антиген-презентирующие клетки.

[0009] В некоторых вариантах осуществления, сбор на Стадии (e) осуществляется с использованием мембранной системы процессирования клеток.

[0010] В некоторых вариантах осуществления, сбор на Стадии (e) осуществляется с использованием системы процессирования клеток LOVO.

[0011] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 4 - примерно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

[0012] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно от 30 примерно до 60 фрагментов с общим объемом примерно от 1300 мм^3 примерно до 1500 мм^3 .

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

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

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

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

[0017] В некоторых вариантах осуществления, концентрация IL-2 составляет примерно 10000 ME/мл - примерно 5000 ME/мл.

[0018] В некоторых вариантах осуществления, концентрация IL-15 составляет примерно 500 ME/мл - примерно 100 ME/мл.

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

[0020] В некоторых вариантах осуществления, инфузионный мешок на Стадии (f) представляет собой инфузионный мешок, содержащий Hypothermosol.

[0021] В некоторых вариантах осуществления, среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (DMSO). В некоторых вариантах осуществления, среда для криоконсервирования содержит 7% - 10% диметилсульфоксида (DMSO).

[0022] В некоторых вариантах осуществления, первый период на Стадии (c) и второй период на Стадии (e), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0023] В некоторых вариантах осуществления, первый период на Стадии (с) и второй период на Стадии (е), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 11 дней.

[0024] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 22 дня.

[0025] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 20 дней примерно до 22 дня.

[0026] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 15 дней примерно до 20 дней.

[0027] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 20 дней.

[0028] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 15 дней.

[0029] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются за 22 дня или меньше.

[0030] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются за 20 дней или меньше.

[0031] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются за 15 дней или меньше.

[0032] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а) - (f) осуществляются за 10 дней или меньше.

[0033] В некоторых вариантах осуществления, стадии (а)-(f) и криоконсервирование осуществляются за 22 дня или меньше.

[0034] В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая популяция ТП, собранная на Стадии (е), содержит достаточно ТП для терапевтически эффективного дозирования ТП.

[0035] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП достаточное для терапевтически эффективного дозирования составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

[0036] В некоторых вариантах осуществления, стадии (b) - (е) осуществляются в одном контейнере, где осуществление стадий (b) - (е) в одном контейнере дает в результате увеличение выхода ТП на одну резецированную опухоль по сравнению с осуществлением стадий (b) - (е) в нескольких контейнерах.

[0037] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки добавляют к ТП в ходе второго периода на Стадии (d) без открывания системы.

[0038] В некоторых вариантах осуществления, третья популяция ТП на Стадии (d) обеспечивает повышенную эффективность, повышение продуцирования интерферона-гамма, повышение поликлональности, повышение среднего уровня IP-10, и/или повышение среднего уровня MCP-1 при введении субъекту.

[0039] В некоторых вариантах осуществления, третья популяция ТП на Стадии (d)

обеспечивает, по меньшей мере, пятикратное или более продуцирование интерферона-гамма при введении субъекту.

[0040] В некоторых вариантах осуществления, третья популяция ТП на Стадии (d) представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции ТП, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

[0041] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные от третьей популяции ТП, демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученными от второй популяции клеток.

[0042] В некоторых вариантах осуществления, риск микробного загрязнения уменьшается по сравнению с открытой системой.

[0043] В некоторых вариантах осуществления, ТП со стадии (g) вливают пациенту.

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

[0045] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

[0046] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0047] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0048] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на ТП из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

[0049] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на ТП от первого размножения или ТП от второго размножения или как того, так и другого

[0050] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

[0051] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до стадии (c), до стадии (d) или до стадии (e).

[0052] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0053] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0054] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования TIL для ОКТ-3.

[0055] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

[0056] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, и GUCY1B3.

[0057] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

[0058] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0059] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

[0060] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

[0061] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ CRISPR.

[0062] В некоторых вариантах осуществления, способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

[0063] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ TALE.

[0064] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

[0065] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта с раковым заболеванием, способ включает введение размноженных инфультирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающий:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции TIL, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции TIL, где вторая популяция TIL, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция TIL, и где переход от стадии (b) до стадии (c) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции TIL дополнительным IL-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции TIL, где третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (e) осуществляется без открывания системы; и

(f) перенос собранной популяции TIL на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы;

(g) необязательное криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию TIL со стадии (f), используя способ криоконсервирования;

(h) введение терапевтически эффективной дозировки третьей популяции TIL из инфузионного мешка со стадии (g) пациенту; и

(i) в любой момент времени в ходе способа стадии (a)-(f), редактирование генома, по меньшей мере, части TIL.

[0066] В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая популяция TIL,

собранный на Стадии (е), содержит достаточно ТП для введения терапевтически эффективной дозы ТП на Стадии (h).

[0067] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на Стадии (h) составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

[0068] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки (АРС) представляют собой РВМС.

[0069] В некоторых вариантах осуществления, РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9-14 на Стадии (d).

[0070] В некоторых вариантах осуществления, до введения терапевтически эффективной дозы клеток ТП на Стадии (h), пациенту вводится режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

[0071] В некоторых вариантах осуществления, режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает стадии введения циклофосфамида при дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ в течение двух дней с последующим введением флударабина при дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ в течение пяти дней.

[0072] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает стадию лечения пациента с помощью режима с высокими дозами IL-2, начиная со дня после введения клеток ТП пациенту на Стадии (h).

[0073] В некоторых вариантах осуществления, режим с высокими дозами IL-2 содержит 600000 или 720000 МЕ/кг, которые вводятся как 15-минутная внутривенная инфузия болюса каждые восемь часов, пока не возникнет толерантность.

[0074] В некоторых вариантах осуществления, третья популяция ТП на Стадии (d) представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит повышенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции ТП, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56, по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

[0075] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные Т-клетки и/или центральные клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

[0076] В некоторых вариантах осуществления, рак выбирается из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая карциному сквамозных клеток головы и

шеи (HNSCC)), рака почек и почечноклеточного рака.

[0077] В некоторых вариантах осуществления, рак выбирается из группы, состоящей из меланомы, HNSCC, рака шейки матки и NSCLC.

[0078] В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой меланому.

[0079] В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой HNSCC.

[0080] В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак шейки матки.

[0081] В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой NSCLC.

[0082] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

[0083] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0084] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0085] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на TIL из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

[0086] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на TIL от первого размножения или TIL от второго размножения, или как от того, так и от другого.

[0087] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

[0088] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до стадии (c), до стадии (d) или до стадии (e).

[0089] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0090] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0091] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования TIL для ОКТ-3.

[0092] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые

должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

[0093] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[0094] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

[0095] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0096] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

[0097] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

[0098] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ CRISPR.

[0099] В некоторых вариантах осуществления, способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

[0100] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ TALE.

[0101] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

[0102] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) добавление переработанных фрагментов опухоли из опухоли, резецированной у пациента, в замкнутой системе для получения первой популяции TIL;

(b) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, и необязательно,

ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (а) до стадии (b) осуществляется без открывания системы;

(с) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ПЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТП, где третья популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (b) до стадии (с) осуществляется без открывания системы;

(d) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (с), где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) перенос собранной популяции ТП со стадии (d) в инфузионный мешок, где переход от стадии (d) до (е) осуществляется без открывания системы; и

(f) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТП.

[0103] В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая популяция ТП, собранная на Стадии (d), содержит достаточно ТП для терапевтически эффективного дозирования ТП.

[0104] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП достаточное для терапевтически эффективного дозирования составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

[0105] В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает стадию криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТП, используя способ криоконсервирования.

[0106] В некоторых вариантах осуществления, способ криоконсервирования осуществляется с использованием отношения собранной популяции ТП к среде криоконсервирования 1:1.

[0107] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки представляют собой моноклеары периферической крови (РВМС).

[0108] В некоторых вариантах осуществления, РВМС являются облученными и аллогенными.

[0109] Способ по п.68, где РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9 - 14 на Стадии (с).

[0110] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки представляют собой искусственные антиген-презентирующие клетки.

[0111] В некоторых вариантах осуществления, сбор на Стадии (d) осуществляется с использованием системы процессирования клеток LOVO.

[0112] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 4 - примерно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

[0113] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно от 30 примерно до 60 фрагментов с общим объемом примерно 1300 мм^3 - примерно 1500 мм^3 .

[0114] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм^3 .

[0115] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общей массой примерно от 1 грамма примерно до 1,5 грамма.

[0116] В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 4 фрагмента.

[0117] В некоторых вариантах осуществления, вторая среда для культивирования клеток предусматривается в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для клеток Xuri.

[0118] В некоторых вариантах осуществления, инфузионный мешок на Стадии (e) представляет собой инфузионный мешок, содержащий Hypothermosol.

[0119] В некоторых вариантах осуществления, первый период на Стадии (b) и второй период на Стадии (c), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 10 дней, 11 дней или 12 дней.

[0120] В некоторых вариантах осуществления, первый период на Стадии (b) и второй период на Стадии (c), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 11 дней.

[0121] В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) - (e) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 22 дня.

[0122] В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) - (e) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 20 дней.

[0123] В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) - (e) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 15 дней.

[0124] В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) - (e) осуществляются за 22 дня или меньше.

[0125] В некоторых вариантах осуществления, стадии (a)-(e) криоконсервирование осуществляется за 22 дня или меньше.

[0126] В некоторых вариантах осуществления, стадии (b) - (e) осуществляются в одном контейнере, где осуществление стадий (b) - (e) в одном контейнере дает в результате увеличение выхода ТП на одну резецированную опухоль по сравнению с осуществлением стадий (b) - (e) в нескольких контейнерах.

[0127] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки добавляют в ТП в ходе второго периода на Стадии (c) без открывания системы.

[0128] В некоторых вариантах осуществления, третья популяция TIL на Стадии (d) представляет собой терапевтическую популяцию TIL, которая содержит повышенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции TIL, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции TIL, демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

[0129] В некоторых вариантах осуществления, эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции TIL, демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

[0130] В некоторых вариантах осуществления, риск микробного загрязнения уменьшается по сравнению с открытой системой.

[0131] В некоторых вариантах осуществления, TIL со стадии (e) вливают пациенту.

[0132] В некоторых вариантах осуществления, закрытый контейнер содержит один биореактор.

[0133] В некоторых вариантах осуществления, закрытый контейнер содержит G-REX-10.

[0134] В некоторых вариантах осуществления, закрытый контейнер содержит G-REX-100.

[0135] В некоторых вариантах осуществления, на Стадии (d) антиген-презентирующие клетки (APC) добавляют в культуру клеток второй популяции TIL при отношении APC:TIL от 25:1 до 100:1.

[0136] В некоторых вариантах осуществления, культура клеток имеет отношение $2,5 \times 10^9$ APC на 100×10^6 TIL.

[0137] В некоторых вариантах осуществления, на Стадии (c) антиген-презентирующие клетки (APC) добавляют в культуру клеток второй популяции TIL при отношении APC:TIL от 25:1 до 100:1.

[0138] В некоторых вариантах осуществления, культура клеток имеет отношение $2,5 \times 10^9$ APC к 100×10^6 TIL.

[0139] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

[0140] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0141] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома

осуществляется до того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0142] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на TIL из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

[0143] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на TIL от первого размножения или TIL от второго размножения, или как от того, так и от другого.

[0144] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

[0145] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до стадии (b), до стадии (c) или до стадии (d).

[0146] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0147] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0148] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования TIL для ОКТ-3.

[0149] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

[0150] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[0151] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

[0152] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных

контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0153] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

[0154] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

[0155] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ CRISPR.

[0156] В некоторых вариантах осуществления, способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

[0157] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ TALE.

[0158] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

[0159] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает популяцию терапевтических ТП, которые размножают согласно любому из способов размножения, описанных в настоящем документе (например, для использования при лечении рака у субъекта), где популяция терапевтических ТП подвергается постоянному редактированию генома.

[0160] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает популяцию размножившихся ТП для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием, где популяция размножившихся ТП представляет собой третью популяцию ТП, получаемую с помощью способа, включающего:

(а) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у субъекта, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП и где переход от стадии (b) до стадии (с) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для

культивирования клеток второй популяции ТПЛ дополнительным ПЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТПЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней, для получения третьей популяции ТПЛ, где третья популяция ТПЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТПЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) сбор терапевтической популяции ТПЛ, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (е) осуществляется без открывания системы;

(f) перенос собранной популяции ТПЛ на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы;

(g) необязательное криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТПЛ со стадии (f), используя способ криоконсервирования; и

(h) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТПЛ.

[0161] В некоторых вариантах осуществления, рассмотренный выше способ дополнительно включает один или несколько признаков, приведенных в любом из способов и композиций, описанных в настоящем документе.

[0162] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1ВВ и/или агонист ОХ40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого

[0163] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1ВВ и/или агонист ОХ40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0164] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1ВВ и/или агонист ОХ40 вводится в среду для культивирования клеток.

[0165] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на ТПЛ из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

[0166] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется на ТПЛ от первого размножения или ТПЛ от второго размножения, или как от того, так и от другого.

[0167] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

[0168] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома осуществляется до стадии (с), до стадии (d) или до стадии (е).

[0169] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для

культивирования клеток.

[0170] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0171] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования TIL для ОКТ-3.

[0172] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

[0173] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[0174] В некоторых вариантах осуществления, один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

[0175] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0176] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

[0177] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

[0178] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает способ CRISPR.

[0179] В некоторых вариантах осуществления, способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

[0180] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает

способ TALE.

[0181] В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

[0182] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ, включающий:

(a) получение первой популяции ТИЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и необязательно содержащей ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3 для получения второй популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТИЛ, где вторая популяция ТИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТИЛ, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТИЛ, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТИЛ в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТИЛ дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТИЛ, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТИЛ, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТИЛ;

(i) перенос собранной популяции ТИЛ в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТИЛ, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких

палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3), и их сочетаний.

[0183] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает способ лечения субъекта с раковым заболеванием, способ, включающий введение размноженных инфультирующих опухоль лимфоцитов (TIL), который включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и необязательно содержащей ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3, для получения второй популяции TIL, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции TIL, где вторая популяция TIL, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция TIL, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции TIL, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции TIL в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции TIL дополнительным IL-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом OX40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции TIL, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL;

(i) перенос собранной популяции TIL в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы;

(j) криоконсервирование собранной популяции TIL? используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида; и

(k) введение терапевтически эффективной дозы собранной популяции ТП из инфузионного мешка пациенту;

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3), и их сочетания.

[0184] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает популяцию размножившихся ТП для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием, где популяция размножившихся ТП представляет собой собранную популяцию ТП, получаемую с помощью способа, включающего:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и необязательно содержащей ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3), и их сочетания.

[0185] В некоторых вариантах осуществления, способ включает осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB, где ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB необязательно присутствуют в среде для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1.

[0186] В другом варианте осуществления, настоящее изобретение предлагает композицию для криоконсервирования, содержащую популяцию ТП, для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием, криопротекторную среду, содержащую DMSO и раствор электролита.

[0187] В некоторых вариантах осуществления, композиция для криоконсервирования может дополнительно содержать один или несколько стабилизаторов (например, HSA) и один или несколько факторов роста лимфоцитов (например, ИЛ-2).

[0188] В некоторых вариантах осуществления, криопротекторная среда, содержащая DMSO и раствор электролита, присутствует при отношении примерно от 1,1:1 примерно до 1:1,1.

[0189] В некоторых вариантах осуществления, композиция для криоконсервирования содержит криопротекторную среду, содержащую DMSO в количестве примерно от 30 примерно до 70 мл, раствор электролита в количестве примерно от 30 примерно до 70 мл, HSA в количестве примерно от 0,1 г примерно до 1,0 г и ИЛ-2 в количестве примерно от 0,001 примерно до 0,005 мг.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0190] Фигура 1: Показывает диаграмму варианта осуществления процесса, 22-дневного процесса получения ТП.

[0191] Фигура 2: Показывает сравнение процесса 1С и варианта осуществления процесса 2А получения ТП.

[0192] Фигура 3: Показывает временной график процесса 1С.

[0193] Фигура 4: Показывает способ варианта осуществления терапии ТП, используя процесс 2А для получения ТП, включающий стадии введения и сочетанной терапии, для более высоких отсчетов клеток.

[0194] Фигура 5: Показывает способ варианта осуществления терапии ТП, используя процесс 2А для получения ТП, включающий стадии введения и сочетанной

терапии, для более низких отсчетов клеток.

[0195] Фигура 6: Показывает подробную блок-схему варианта осуществления процесса 2А.

[0196] Фигуры 7а, 7б и 7с: Изображают главные стадии варианта осуществления процесса 2А, включающего стадии криоконсервирования.

[0197] Фигура 8: Изображает дизайн клинического исследования, включающего когорты, которые лечат с помощью процесса 1С и варианта осуществления процесса 2 А.

[0198] Фигура 9: Иллюстративная блок-схема процесса 2А, предлагающая обзор Стадий А - F.

[0199] Фигура 10: Блок-схема способа согласно плану сбора данных процесса 2А.

[0200] Фигура 11: Диаграмма иллюстративного варианта осуществления протокола быстрого размножения (REP). При получении опухоль фрагментируют, помещают в колбы G-Rex с IL-2 для размножения TIL (пред-REP размножение) в течение 11 дней. Для исследований, тройной коктейль IL-2/IL-15/IL-21 добавляется при иницировании пред-REP. Для протокола быстрого размножения (REP), TIL культивируют вместе с фидерами и ОКТ3 для размножения REP в течение дополнительных 11 дней.

[0201] Фигура 12: Показывает диаграмму варианта осуществления процесса 2А, 22-дневного процесса получения TIL.

[0202] Фигура 13: Таблица сравнения Стадий А-F иллюстративных вариантов осуществления процесса 1С и процесса 2А.

[0203] Фигура 14: Подробное сравнение варианта осуществления процесса 1С и варианта осуществления процесса 2А.

[0204] Фигура 15: Подробная схема варианта осуществления способа терапии TIL.

[0205] Фигура 16: картина варианта осуществления способа получения криоконсервированных TIL (22 дня).

[0206] Фигура 17: Таблица улучшений способа от Gen 1 до Gen 2.

[0207] Фигура 18: Вариант осуществления способа получения TIL по настоящему изобретению.

[0208] Фигура 19: Блок-схема процесса 2А.

[0209] Фигура 20: картина варианта осуществления способа получения TIL, включающего стадию электропорообразования, для использования вместе с процессами редактирования генома (включая способы TALEN, цинк-пальцевой нуклеазы и способы CRISPR, как описано в настоящем документе).

[0210] Фигура 21: картина вариантов осуществления способа получения TIL, включающего стадию электропорообразования, для использования вместе с процессами редактирования генома (включая способ TALEN, цинк-пальцевой нуклеазы и способы CRISPR, как описано в настоящем документе).

[0211] Фигура 22: Изображение структур I-A и I-B, цилиндры относятся к индивидуальным доменам связывания полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных домена связывания TNFRSF, полученных, например, из 4-1BBL или

антитела, которое связывает 4-1BB, которые складываются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком с помощью IgG1-Fc (включая домены CH3 и CH2), который затем используют для связывания вместе двух трехвалентных белков с помощью дисульфидных связей (малые продолговатые овалы), стабилизируя структуру и обеспечивая агонисты способные сводить вместе внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием комплекса передачи сигналов. Домены связывания TNFRSF, маркированные как цилиндры, могут представлять собой домены scFv, содержащие, например, VH и VL цепи, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости.

[0212] Фигура 23: Изображение конструктора TALEN, который нацелен на экзон 2 гена *Pdcd1*.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Введение

[0213] Адоптивная клеточная терапия, использующая ТИЛ, культивируемые *ex vivo* с помощью протокола быстрого размножения (REP), дает успешную адоптивную клеточную терапию после иммуноподавления хозяина для пациентов с меланомой. Современные принятые параметры инфузии основываются на данных по композиции ТИЛ (*например*, CD28, CD8 или CD4 положительности) и на кратности размножения и жизнеспособности продукта REP.

[0214] Современные протоколы REP уделяют мало внимания здоровью ТИЛ, которые будут вливаться пациенту. Т-клетки подвергаются воздействию выраженного метаболического сдвига при их созревании от наивных до эффекторных Т-клеток (смотри Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2016, 17, 364, которая тем самым включается в явном виде во всей своей полноте, и в частности, для обсуждения и маркеров анаэробного и аэробного метаболизма). Например, наивные Т-клетки основываются на митохондриальном дыхании для получения АТФ, в то время как зрелые здоровые эффекторные Т-клетки, такие как ТИЛ, являются в высшей степени гликолитическими, основываясь на аэробном гликолизе для обеспечения субстратов для биоэнергетики, которые они требуют для пролиферации, миграции, активации и противоопухолевой эффективности.

[0215] Предыдущие работы сообщают, что ограничение гликолиза и ускорение митохондриального метаболизма в ТИЛ перед переносом является желательным, поскольку клетки, сильно зависящие от гликолиза, будут страдать от питательной депривации при адоптивном переносе, что приводит в результате к гибели большинства перенесенных клеток. Таким образом, в данной области известно, что ускорение митохондриального метаболизма могло бы способствовать увеличению продолжительности жизни *in vivo*, и фактически это говорит о необходимости использования ингибиторов гликолиза перед индуцированием иммунной реакции. Смотри Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* 2016, 17(364).

[0216] Кроме того, настоящее изобретение направлено в некоторых вариантах осуществления на способы оценки и количественного определения того, как это повышает

метаболическое здоровье. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способы анализа относительного здоровья популяции ТП, используя одну или несколько общих оценок метаболизма, включая, но не ограничиваясь этим, скорости и величины гликолиза, окислительного фосфорилирования, резервной респираторной емкости (SRC) и гликолитического резерва.

[0217] Кроме того, настоящее изобретение направлено в некоторых вариантах осуществления на способы оценки и количественного определения того, как это повышает метаболическое здоровье. Таким образом, настоящее изобретение предлагает способы анализа относительного здоровья популяции ТП, используя одну или нескольких общих оценок метаболизма, включая, но, не ограничиваясь этим, скорости и величины гликолиза, окислительного фосфорилирования, резервной респираторной емкости (SRC) и гликолитического резерва.

[0218] В дополнение к этому, необязательные дополнительные оценки включают, но, не ограничиваясь этим, продуцирование АТФ, митохондриальную массу и потребление глюкозы.

[0219] Кроме того, настоящее изобретение направлено в некоторых вариантах осуществления на усиление терапевтического воздействия ТП при использовании технологии редактирования гена. В то время как адоптивный перенос инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ТИ) предлагает обещающую и эффективную терапию, имеется сильная необходимость в более эффективной терапии ТП, которая может повысить скорость реакции пациента и устойчивость реакции. Как описано в настоящем документе, варианты осуществления настоящего изобретения предлагают способы размножения ТП в виде терапевтической популяции, которая подвергается редактированию генома для обеспечения усиленного терапевтического воздействия.

II. Определения

[0220] Если не определено иного, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют такое значение, как обычно понимается специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, упоминаемые в настоящем документе, включаются в качестве ссылок во всей своей полноте.

[0221] Термин “*in vivo*” относится к событию, которое имеет место в организме субъекта.

[0222] Термин “*in vitro*” относится к событию, которое имеет место вне организма субъекта. Анализы *in vitro* охватывают клеточные анализы, в которых используются живые или мертвые клетки, и могут также охватывать бесклеточный анализ, в котором не используют интактных клеток.

[0223] Термин “*ex vivo*” относится к событию, которое включает обработку или осуществление процедуры на клетке, ткани и/или органе, который удален из организма субъекта. Соответствующим образом, клетка, ткань и/или орган могут быть возвращены в организм субъекта в способе хирургии или лечения.

[0224] Термин “быстрое размножение” означает увеличение количества антиген-специфичных ТИЛ, по меньшей мере, примерно в 3 раза (или 4-, 5-, 6-, 7-, 8- или 9-кратное) в течение периода в неделю, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно в 10 раз (или 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80- или 90-кратное) в течение периода в неделю, или наиболее предпочтительно, по меньшей мере, примерно в 100 раз в течение периода в неделю. Ряд протоколов быстрого размножения описан ниже.

[0225] Под “инфильтрующими опухоль лимфоцитами” или “ТИЛ” в настоящем документе подразумевается популяция клеток, исходно полученная из лейкоцитов, которые покидают кровоток субъекта и мигрируют в опухоль. ТИЛ включают, но, не ограничиваясь этим, цитотоксичные $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), $CD4^+$ Т-клетки Th1 и Th17, природные клетки киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. ТИЛ включают как первичные, так и вторичные ТИЛ. “Первичные ТИЛ” представляют собой такие, которые получают из образцов ткани пациента, как приведено в настоящем документе (иногда упоминаются как “свежесобранные”), а “вторичные ТИЛ” представляют собой любые популяции клеток ТИЛ, которые размножаются или профилируются, как обсуждается в настоящем документе, включая, но не ограничиваясь этим, объемные ТИЛ и размноженные ТИЛ (“REP ТИЛ” или “пост-REP ТИЛ”). Популяции клеток ТИЛ могут включать генетически модифицированные ТИЛ.

[0226] Под “популяцией клеток” (включая ТИЛ) в настоящем документе подразумевается некоторое количество клеток, которые разделяют между собой общие свойства. Как правило, популяции, находятся в пределах от 1×10^6 до 1×10^{10} по количеству, при этом различные популяции ТИЛ содержат различные количества. Например, начальный рост первичных ТИЛ в присутствии ИЛ-2 дает в результате популяцию объемных ТИЛ примерно из 1×10^8 клеток. Размножение REP, как правило, осуществляется для получения популяции из $1,5 \times 10^9$ - $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии.

[0227] Под “криоконсервированными ТИЛ” в настоящем документе подразумевается, что ТИЛ, либо первичные, либо объемные, либо размноженные (REP ТИЛ), процессируются и хранятся в пределах примерно от -150°C до -60°C . Общие способы криоконсервирования также описаны в настоящем документе в другом месте, включая Примеры. Для ясности, “криоконсервированные ТИЛ” отличаются от замороженных образцов ткани, которые можно использовать как источник первичных ТИЛ.

[0228] Под “оттаянными криоконсервированными ТИЛ” в настоящем документе подразумевается популяции ТИЛ, которые предварительно криоконсервируются, а затем процессируются и возвращаются до комнатной или более высокой температуры, включая но, не ограничиваясь этим, температуры культур клеток или температуры, при которых ТИЛ могут вводиться пациенту.

[0229] ТИЛ, как правило, могут определяться либо биохимически, используя клеточные поверхностные маркеры, либо функционально, по их способности инфильтрироваться в опухоли и осуществлять лечение. ТИЛ могут, в целом, разделяться на категории по экспрессированию одного или нескольких из следующих биомаркеров: $CD4$,

CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. В дополнение к этому или альтернативно, TIL могут функционально определяться по их способности к инфильтрации в твердые опухоли при повторном введении пациенту.

[0230] Термин “среды для криоконсервирования” или “среда для криоконсервирования” относится к любой среде, которую можно использовать для криоконсервирования клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие 7% - 10% DMSO. Иллюстративные среды включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их сочетания. Термин “CS10” относится к среде для криоконсервирования, которую получают от Stemcell Technologies или от Biolife Solutions. Среда CS10 может упоминаться под торговым наименованием “CryoStor® CS10”. Среда CS10 представляет собой не содержащую сыворотки, не содержащую животных компонентов среду, которая содержит DMSO.

[0231] Термин “центральная Т-клетка памяти” относится к подмножеству Т-клеток, которые у человека являются CD45R0+ 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 как эффекторные молекулы после запуска TCR. Центральные Т-клетки памяти доминируют в отделении CD4 в крови, и у человека они пропорционально обогащены в лимфатических узлах и в миндалинах.

[0232] Термин “эффекторные Т-клетки памяти” относится к подмножеству Т-клеток человека или млекопитающего, которые, подобно центральным Т-клеткам памяти, являются CD45R0+, но потеряли конститутивное экспрессирование CCR7 (CCR7^{lo}) и имеют гетерогенное или низкое экспрессирование 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 высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, включая интерферон- γ , IL-4 и IL-5. Эффекторные Т-клетки памяти доминируют в отделении CD8 в крови, и у человека они пропорционально обогащены в легких, печени и кишках. Эффекторные Т-клетки памяти CD8+ несут большие количества перфорины.

[0233] Термин “замкнутая система” относится к системе, которая является замкнутой для окружающей среды снаружи нее. В способах настоящего изобретения можно использовать любую замкнутую систему пригодную для способов культивирования клеток. Замкнутые системы включают, например, но, не ограничиваясь этим, закрытые G-контейнеры. После того, как сегмент опухоли добавляют в замкнутую систему, систему не открывают для окружающей среды снаружи, пока TIL не будут готовы для введения пациенту.

[0234] Термины “фрагментирование”, “фрагмент” и “фрагментированный”, как используется в настоящем документе, описывают способы разрушения опухоли, они

включают способы механического фрагментирования, такие как измельчение, резка тонкими слоями, разделение и удаление по частям ткани опухоли, а также любой другой способ разрушения физической структуры ткани опухоли.

[0235] Термины “моноклеары периферической крови” и “РВМС” относятся к клеткам периферической крови, имеющим круглое ядро, включая лимфоциты (Т-клетки, В-клетки, НК клетки) и моноциты. Предпочтительно, моноклеары периферической крови представляют собой облученные аллогенные моноклеары периферической крови. РВМС представляют собой тип антиген-презентирующей клетки.

[0236] Термин “антитело анти-CD3” относится к антителу или его варианту, *например*, моноклональному антителу и включает человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, которые направлены против рецептора CD3 в рецепторе антигена Т-клетки зрелых Т-клеток. Антитела анти-CD3 включают ОКТ-3, также известное как муромонаб. Антитела анти-CD3 также включают клон UHCT1, также известный как Т3 и CD3ε. Другие антитела анти-CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

[0237] Термин “ОКТ-3” (также упоминается в настоящем документе как “ОКТ3”) относится к моноклональному антителу или его биологически подобному соединению или к его варианту, включая человеческие, гуманизированные, химерные или мышинные антитела, направленные против рецептора CD3, в рецепторе антигена Т-клетки зрелых Т-клеток, и включает коммерчески доступные формы, такие как ОКТ-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 чистый, Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA) и муромонаб или варианты, консервативные замещения аминокислот, гликоформы, или их биологически подобные соединения. Последовательности аминокислот тяжелых и легких цепей муромонаба приведены в Таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома способная продуцировать ОКТ-3 находится как депозит в American Type Culture Collection, ей присваивается номер доступа ATCC CRL 8001. Гибридома способная продуцировать ОКТ-3 также находится как депозит в European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), и ей присваивается Catalogue No. 86022706. Антитела анти-CD3 также включают клон UHCT1 (коммерчески доступный от BioLegend, San Diego, CA, USA) известный также как Т3 и CD3ε.

Таблица 1. Последовательность аминокислот муромонаба.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
Тяжелая цепь муромонаба SEQ ID NO:1	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTN Y 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFP AVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300

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

[0238] Термин “IL-2” (также упоминается в настоящем документе как “IL2”) относится к фактору роста Т-клеток известному как интерлейкин-2 и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, консервативные замещения аминокислот, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-2 описываются, *например*, в Nelson, *J. Immunol.* 2004, 172, 3983-88 и Malek, *Annu. Rev. Immunol.* 2008, 26, 453-79, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот рекомбинантного IL-2 человека пригодного для использования по настоящему изобретению приведены в Таблице 2 (SEQ ID NO:3). Например, термин IL-2 охватывает рекомбинантные формы IL-2 человека, такие как альдеслейкин (PROLEUKIN доступный коммерчески от множества поставщиков в одноразовых флаконах с 22 миллионами МЕ), а также форму рекомбинантного IL-2 коммерчески поставляемую CellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-209-b) и другие коммерческие эквиваленты от других продавцов. Альдеслейкин (дес-аланил-1, серин-125 IL-2 человека) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму IL-2 человека с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Последовательности аминокислот альдеслейкина пригодного для использования по настоящему изобретению приведены в Таблице 2 (SEQ ID NO:4). Термин IL-2 также охватывает пегилированные формы IL-2, как описано в настоящем документе, включая пролекарство пегилированного IL2 NKTR-214 доступное от Nektar Therapeutics, South San Francisco, CA, USA. NKTR-214, и пегилированный IL-2 пригодный для использования по настоящему изобретению описан в публикации заявки на патент США № US 2014/0328791 A1 и в публикации заявки на Международный патент № WO 2012/065086 A1, описания которых включаются в качестве ссылок в настоящий документ. Альтернативные формы конъюгированного IL-2 пригодные для использования по настоящему изобретению описаны в патентах США №№ 4766106, 5206344, 5089261 и 4902502, описания которых включаются в качестве ссылок в настоящий документ. Препараты IL-2 пригодные для использования по настоящему изобретению описываются в патенте США № 6706289, описание которого включается в качестве ссылки в настоящий документ.

Таблица 2. Последовательность аминокислот интерлейкинов.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:3 Рекомбинантный IL-2 человека (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 IVLELKGSSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 Рекомбинантный IL-4 человека (rhIL-4)	MHKCDITLQE IKTLSNLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 Рекомбинантный IL-7 человека (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60 ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 Рекомбинантный IL-15 человека (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 Рекомбинантный IL-21 человека (rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

[0239] Термин “IL-4” (также упоминается в настоящем документе как “IL4”) относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируется Т-клетками Th2 и эозинофилами, базофилами и тучными клетками. IL-4 регулирует дифференциацию наивных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, *Respir. Res.* 2001, 2, 66-70. При активировании IL-4, Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный IL-4 в петле положительной обратной связи. IL-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессирование МНС класса II и индуцирует переключение класса на IgE и экспрессирование IgG₁ В-клетками. Рекомбинантный IL-4 человека пригодный для использования по настоящему изобретению является коммерчески доступным от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, Cat. No. Gibco CTP0043). Последовательность аминокислот рекомбинантного IL-4 человека пригодного для использования по настоящему изобретению приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO:5).

[0240] Термин “IL-7” (также упоминается в настоящем документе как “IL7”) относится к гликозилированному, полученному из ткани цитокину, известному как

интерлейкин 7, который можно получить 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 рецептора IL-7 и обычного рецептора гамма цепи, который находится в ряду сигналов, важных для развития Т-клеток в тимусе и выживания на периферии. Рекомбинантный IL-7 человек пригодный для использования по настоящему изобретению является коммерчески доступным от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человек, Cat. No. Gibco PHC0071). Последовательность аминокислот рекомбинантного IL-7 человека пригодного для использования по настоящему изобретению приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO:6).

[0241] Термин “IL-15” (также упоминается в настоящем документе как “IL15”) относится к фактору роста Т-клеток известному как интерлейкин-15 и включает все формы IL-2, включая формы человека и млекопитающих, консервативные замещения аминокислот, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-15 описывается, *например*, в Fehniger and Caligiuri, *Blood* 2001, 97, 14-32, описание которой включается в качестве ссылки в настоящий документ. IL-15 разделяет субъединицы сигнальных рецепторов β и γ с IL-2. Рекомбинантный IL-15 человека представляет собой одинарную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-конечный метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный IL-15 человека является коммерчески доступным от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-15 человека, Cat. No. 34-8159-82). Последовательность аминокислот рекомбинантного IL-15 человека пригодного для использования по настоящему изобретению приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO:7).

[0242] Термин “IL-21” (также упоминается в настоящем документе как “IL21”) относится к плеотропному цитокиновому белку, известному как интерлейкин-21, и включает все формы IL-21, включая формы человека и млекопитающих, консервативные замещения аминокислот, гликоформы, биологически подобные соединения и их варианты. IL-21 описан, *например*, в Spolski and Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* 2014, 13, 379-95, описание которой включается в качестве ссылки в настоящий документ. IL-21 в основном продуцируется природными Т-клетками киллерами и активированными Т-клетками CD4⁺ человека. Рекомбинантный IL-21 человека представляет собой одинарную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислот с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный IL-21 человека является коммерчески доступным от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA (Cat. No. CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA (рекомбинантный белок IL-21 человека, Cat. No. 14-8219-80). Последовательность аминокислот рекомбинантного IL-21 человека пригодного для использования по настоящему изобретению приведена в Таблице 2 (SEQ ID NO:8).

[0243] Когда указывается “противоопухолевое эффективное количество”, “ингибирующее опухоль эффективное количество” или “терапевтическое количество”, точное количество композиций по настоящему изобретению, которое должно вводиться, может определяться врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе, размере опухоли, степени инфекции или метастаз и состояния пациента (субъекта). В целом можно утверждать, что фармацевтическая композиция, содержащая инфильтрующие опухоль лимфоциты (например, вторичные ТИЛ или генетически модифицированные цитотоксичные лимфоциты), описанная в настоящем документе, может вводиться при дозе 10^4 - 10^{11} клеток/кг массы тела (например, 10^5 - 10^6 , 10^5 - 10^{10} , 10^5 - 10^{11} , 10^6 - 10^{10} , 10^6 - 10^{11} , 10^7 - 10^{11} , 10^7 - 10^{10} , 10^8 - 10^{11} , 10^8 - 10^{10} , 10^9 - 10^{11} или 10^9 - 10^{10} клеток/кг массы тела), включая все целочисленные значения в этих диапазонах. Композиции инфильтрующих опухоль лимфоцитов (включая в некоторых случаях генетически модифицированные цитотоксичные лимфоциты) могут также вводиться множество раз при этих дозах. Инфильтрующие опухоль лимфоциты (включая в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксичные лимфоциты) могут вводиться, используя методики инфузии, которые широко известны в иммунотерапии (смотри, например, Rosenberg et al., *Нов. Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988). Оптимальная доза и режим лечения для конкретного пациента может легко определяться специалистом в области медицины посредством мониторинга пациента относительно признаков заболевания и соответствующего подбора лечения.

[0244] Термин “гематологическое злокачественное образование” относится к раковым заболеваниям и опухолям гематопоетических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но, не ограничиваясь этим, к тканям крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также упоминаются как “жидкие опухоли”. Гематологические злокачественные новообразования включают, но, не ограничиваясь этим, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лимфому (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), острый миелобластный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфому Ходжкина и лимфому не-Ходжкина. Термин “гематологическое злокачественное новообразование В-клеток” относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, которые воздействуют на В-клетки.

[0245] Термин “твердая опухоль” относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Твердые опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин “твердая раковая опухоль” относится к злокачественным, новообразовавшимся или раковым твердым опухолям. Твердые раковые опухоли включают, но, не ограничиваясь этим, саркому, карциному и лимфому, например, рак легких, рак молочной железы, простаты, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Структура ткани твердых опухолей включает взаимозависимые отделы тканей, включая паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в

которых раковые клетки диспергируются и которые могут обеспечить поддерживающую окружающую среду.

[0246] Термин “жидкая опухоль” относится к аномальной массе клеток, которая является текучей по природе. Жидкие раковые опухоли включают, но не ограничиваясь этим, лейкемии, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные образования. ТП, полученные из жидких опухолей, могут также упоминаться в настоящем документе как инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (МЛ).

[0247] Термин “окружающая среда”, как используется в настоящем документе, может относиться к окружающей среде твердой или гематологической опухоли в целом или к индивидуальному подмножеству клеток в окружающей среде. Окружающая среда опухоли, как используется в настоящем документе, относится к сложной смеси “клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриц и механических стимулов, которые способствуют неопластическому преобразованию, поддерживают рост и инвазию опухоли, защищают опухоль от иммунитета хозяина, стимулируют терапевтическую резистентность и обеспечивают ниши для преобладающего разрастания метастаз”, как описано в Swartz, *et al.*, *Cancer Res.*, 2012, 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, выведение опухоли под действием иммунной системы является редким из-за иммунного подавления под действием окружающей среды.

[0248] В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение включает способ лечения рака с помощью популяции ТП, где пациента предварительно лечат с помощью немиелоаблативной химиотерапии перед инфузией ТП согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, может создаваться популяция ТП, когда пациент предварительно лечится с помощью немиелоаблативной химиотерапии перед инфузией ТП согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов осуществления, немиелоаблативная химиотерапия представляет собой 60 мг/кг/день циклофосфида в течение 2 дней (за 27 и 26 дней до инфузии ТП) и 25 мг/м²/день флударабина в течение 5 дней (за 27-23 дня до инфузии ТП). В одном из вариантов осуществления, после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ТП (в день 0) по настоящему изобретению, пациент получает внутривенную инфузию IL-2 внутривенно при 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до появления физиологической толерантности.

[0249] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоль-специфичных Т лимфоцитов играет ключевую роль в усилении эффективности лечения посредством устранения регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы (“стоков цитокинов”). Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения используют стадию лимфодеплеции (иногда также упоминаемую как “иммуносупрессивное кондиционирование”) для пациента перед введением гТП по настоящему изобретению.

[0250] Термины “совместное введение”, “сочетанное введение”, “вводимые в сочетании с”, “введение в сочетании с”, “одновременно” и “вместе”, как используется в

настоящем документе, охватывают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, например, по меньшей мере, одного агониста калиевых каналов в сочетании с множеством TIL) субъекту, так что как активные фармацевтические ингредиенты, так и/или их метаболиты присутствуют в субъекте в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение отдельных композиций, введение в различные 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 агента, являются предпочтительными.

[0251] Термин “эффективное количество” или “терапевтически эффективное количество” относится к такому количеству соединения или сочетания соединений, как описано в настоящем документе, которое является достаточным для осуществления предполагаемого применения, включая, но, не ограничиваясь этим, лечение заболевания. Терапевтически эффективное количество может изменяться в зависимости от предполагаемого применения (*in vitro* или *in vivo*) или субъекта и болезненного состояния, которое лечится (например, от массы, возраста и пола субъекта), от тяжести болезненного состояния или от способа введения. Термин также применяется к дозе, которая вызовет конкретную реакцию в целевых клетках (например, уменьшение адгезии тромбоцитов и/или миграции клеток). Конкретная доза будет изменяться в зависимости от конкретных выбранных соединений, режима дозирования, которому следуют, от того вводится ли соединение в сочетании с другими соединениями, от временного графика введения, от ткани, в которую оно вводится, и от физической системы доставки, в которой переносится соединение.

[0252] Термины “лечение”, “лечащий”, “лечить” и тому подобное, относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического воздействия. Воздействие может быть профилактическим, в терминах полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома, и/или оно может быть терапевтическим, в терминах частичного или полного излечения заболевания и/или отрицательного воздействия, присваиваемого заболеванию. “Лечение”, как используется в настоящем документе, покрывает любое лечение заболевания млекопитающего, в частности, человека, и включает: (a) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но еще не диагностируется как имеющий его; (b) замедление заболевания, то есть, приостановку его развития или хода развития, или хода; и (c) облегчение заболевания, то есть, осуществление обратного развития заболевания и/или ослабление одного или нескольких симптомов заболевания. “Лечение”, как подразумевается, охватывает также доставку агента для обеспечения фармакологического воздействия, даже в отсутствие заболевания или состояния. Например, “лечение” охватывает доставку композиции, которая может вызывать иммунную реакцию или придавать иммунитет в отсутствие болезненного состояния, например, в случае вакцины.

[0253] Термин “гетерологичный”, когда используется при упоминании частей нуклеиновой кислоты или белка, указывает что нуклеиновая кислота или белок содержит две или более субпоследовательности, которые не находятся в таком же соотношении друг с другом в природе. Например, нуклеиновая кислота, как правило, получается рекомбинантно, имеет две или более последовательности от неродственных генов, располагаемые для получения новой функциональной нуклеиновой кислоты, например, промотора из одного источника и кодирующей области из другого источника, или кодирующие области из различных источников. Подобным же образом, гетерологичный белок показывает, что белок содержит две или более субпоследовательности, которые не находятся в таком же соотношении друг с другом в природе (например, слитый белок).

[0254] Термины “идентичность последовательности”, “процент идентичности” и “процент идентичности последовательности” (или их синонимы, например, “идентичная на 99%”) в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов, относятся к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент нуклеотидов или остатков аминокислот, которые являются одинаковыми, когда их сравнивают и выравнивают (вводя разрывы при необходимости) для максимального соответствия, не рассматривая любые консервативные замещения аминокислот как часть идентичности последовательности. Процент идентичности можно измерить, используя программное обеспечение или алгоритмы для сравнения последовательностей, или посредством визуального сравнения. В данной области известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для получения выравнивания последовательностей аминокислот или нуклеотидов. Соответствующие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, набор программ BLAST доступный на вебсайте U.S. Government’s National Center for Biotechnology Information BLAST. Сравнения двух последовательностей можно осуществлять, используя либо алгоритм BLASTN, либо алгоритм BLASTP. BLASTN используется для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, в то время как BLASTP используется для сравнения последовательностей аминокислот. ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) или MegAlign доступный от DNASTAR являются дополнительными публично доступными программами программного обеспечения, которые можно использовать для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области может определить соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретного программного обеспечения для выравнивания. В определенных вариантах осуществления, используются параметры по умолчанию программного обеспечения для совмещения.

[0255] Как используется в настоящем документе, термин “вариант” охватывает, но, не ограничиваясь этим, антитела или слитые белки, которые содержат последовательность аминокислот, которая отличается от последовательности аминокислот эталонного антитела из-за одного или нескольких замещений, делеций и/или добавлений в определенных положениях в последовательности аминокислот эталонного антитела или рядом с ними.

Вариант может содержать одно или несколько консервативных замещений в последовательности аминокислот по сравнению с последовательностью аминокислот эталонного антитела. Консервативные замещения могут включать, например, замещение сходно заряженных или незаряженных аминокислот. Вариант сохраняет способность специфично связываться с антигеном эталонного антитела. Термин вариант также включает пегилированные антитела или белки.

[0256] Под “инфильтрующими опухоль лимфоцитами” или “TIL” в настоящем документе подразумевается популяция клеток, исходно полученных как лейкоциты, которые покидают кровоток субъекта и мигрируют в опухоль. TIL включает, но, не ограничиваясь этим, цитотоксичные $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), $CD4^+$ Т-клетки Th1 и Th17, природные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. “Первичные TIL” представляют собой такие, которые получают из образцов тканей пациентов, как обсуждается в настоящем документе (иногда упоминаются как “свежесобранные”), а “вторичные TIL” представляют собой любые популяции клеток TIL, которые размножаются или пролиферируют, как обсуждается в настоящем документе, включая, но, не ограничиваясь этим, объемные TIL, размноженные TIL (“REP TIL”), а также “geREP TIL”, как обсуждается в настоящем документе. geREP TIL могут включать, например, второе размножение TIL или второе дополнительное размножение TIL (такое, например, как описано на Стадии D Фигуры 9, включая TIL упоминаемые как geREP TIL).

[0257] TIL могут, как правило, определяться либо биохимически, используя клеточные поверхностные маркеры, либо функционально, по их способности к инфильтрации опухолей и осуществлению лечения. TIL могут, в целом, разделяться на категории по экспрессированию одного или нескольких из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. В дополнение к этому, и альтернативно, TIL могут определяться функционально по их способности инфильтрировать твердые опухоли при повторном введении пациенту. TIL могут дополнительно характеризоваться по сильноедействию, например, TIL могут считаться сильноедействующими, если, например, высвобождение интерферона (IFN) больше примерно 50 пг/мл, больше примерно 100 пг/мл, больше примерно 150 пг/мл или больше примерно 200 пг/мл.

[0258] Термины “фармацевтически приемлемый носитель” или “фармацевтически приемлемый наполнитель” предназначаются для включения любых и всех растворителей, диспергирующих сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых агентов, изотонических и замедляющих поглощение агентов и инертных ингредиентов. Использование таких фармацевтически приемлемых носителей или фармацевтически приемлемых наполнителей для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области. За исключением случаев, когда любой обычный фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемый наполнитель является несовместимым с активным фармацевтическим ингредиентом, предполагается его

использование в терапевтических композициях по настоящему изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, также могут включаться в описываемые композиции и способы.

[0259] Термины “примерно” и “приблизительно” означают отклонение в пределах статически значимого диапазона значения. Такой диапазон может быть в пределах порядка величины, предпочтительно, в пределах 50%, более предпочтительно, в пределах 20%, более предпочтительно, еще более в пределах 10%, а еще более предпочтительно, в пределах 5% от данной величины или диапазона. Допустимый разброс, охватываемый терминами “примерно” или “приблизительно”, зависит от конкретной изучаемой системы и может быть легко определен специалистом в данной области. Кроме того, как используется в настоящем документе, термины “примерно” и “приблизительно” означают, что размерности, размеры, препараты, параметры, формы и другие величины и характеристики не должны быть точными, но могут быть приблизительными и/или большими или меньшими, по желанию, отражая допуски, коэффициенты преобразования, округление, ошибку измерения, и тому подобное, и другие факторы известные специалистам в данной области. Как правило, размерность, размер, препарат, параметр, форма или другая величина или характеристика является “примерной” или “приблизительной”, определяется ли она так в явном виде или нет. Отметим, что варианты осуществления с очень разными размерами, формами и размерностями, могут использовать описанные системы.

[0260] Переходные термины “содержащий”, “состоящий в основном из” и “состоящий из”, когда используются в прилагаемой формуле изобретения, в оригинальной и измененной форме, определяют рамки пункта формулы изобретения относительно которого не упомянутые дополнительные элементы или стадии пункта формулы изобретения, если они имеются, исключаются из рамок пункта (пунктов) формулы изобретения. Термин “содержащий”, как подразумевается, является инклюзивным или открытым и не исключает любого дополнительного, неупомянутого элемента, способа, стадии или материала. Термин “состоящий из” исключает любой элемент, стадию или материал иной, чем указано в пункте формулы изобретения и, в последнем случае, примеси, обычно ассоциируемые с указанным материалом (материалами). Термин “состоящий в основном из” ограничивает рамки пункта формулы изобретения указанными элементами, стадиями или материалом (материалами) и теми, которые не влияют существенно на основную и новую характеристику (характеристики) заявляемого изобретения. Все композиции, способы и наборы, описанные в настоящем документе, которые осуществляют настоящее изобретение, могут, в альтернативных вариантах осуществления, определяться более конкретно с помощью любого из переходных терминов “содержащий”, “состоящий в основном из” и “состоящий из”.

III. Способы редактирования генома

Обзор: размножение ТП + редактирование генома

[0261] Варианты осуществления настоящего изобретения направлены на способы

размножения популяций ТП, на способы, включающие одну или несколько стадий редактирования генома, по меньшей мере, части ТП для усиления их терапевтического воздействия. Как используется в настоящем документе, “ген-редактирование”, “редактирование гена” и “редактирование генома” относится к типу генетической модификации, при которой ДНК постоянно модифицируется в геноме клетки, *например*, ДНК подвергается инсерциям, делециям, модификациям или заменам в геноме клетки. В некоторых вариантах осуществления, редактирование генома вызывает выключение экспрессирования последовательности ДНК (иногда упоминается как нокаут гена) или его ингибирование/уменьшение (иногда упоминается как нокдаун гена). В других вариантах осуществления, редактирование генома вызывает усиление экспрессирования последовательности ДНК (*например*, вызывая сверхэкспрессирование). В соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения, технологию редактирования генома используют для повышения эффективности терапевтической популяции ТП.

[0262] Способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТП) в терапевтическую популяцию ТП может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (*например*, иллюстративного способа размножения ТП известного как процесс 2А, описанный ниже), где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТП. Согласно дополнительным вариантам осуществления, способ размножения ТП в терапевтическую популяцию ТП осуществляется согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в РСТ/US2017/058610, РСТ/US2018/012605 или РСТ/US2018/012633, которые включаются в качестве ссылок в настоящий документ во всей своей полноте, где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТП. Таким образом, вариант осуществления настоящего изобретения дает терапевтическую популяцию ТП, которая размножается согласно любому из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, где, по меньшей мере, часть терапевтической популяции подвергается редактированию генома, *например*, по меньшей мере, часть терапевтической популяции ТП, которая переносится в инфузионный мешок, подвергается постоянному редактированию генома.

В. Временной график редактирования генома в ходе размножения ТП

[0263] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТП) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(а) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3 (*например*, ОКТ-3 могут присутствовать в среде для культивирования, начиная с исходной даты процесса размножения), для получения второй популяции ТП, где первое

размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (b) до стадии (c) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТП, где третья популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (e) осуществляется без открывания системы;

(f) перенос собранной популяции ТП на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(g) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТП.

[0264] Как сформулировано на Стадии (g) варианта осуществления, описанного выше, способ редактирования генома может осуществляться в любое время в ходе способа размножения ТП, это означает, что редактирование генома может осуществляться на ТП до, в ходе или после любых стадий способа размножения; например, в ходе любой из стадий (a) - (f), показанных в способе выше, или до или после любой из стадий (a)-(f), описанных в способе выше. Согласно определенным вариантам осуществления, ТП собирают в ходе способа размножения (например, способ размножения “ставится на паузу” по меньшей мере, для части ТП), и собранные ТП подвергаются воздействию способа редактирования генома, и они, в некоторых случаях, впоследствии вводятся обратно в способ размножения (например, обратно в среду для культивирования) для продолжения способа размножения, так что, по меньшей мере, часть терапевтической популяции ТП, которая в конечном счете переносятся в инфузионный мешок, подвергается постоянному редактированию генома. В одном из вариантов осуществления, способ редактирования генома может осуществляться до размножения посредством активирования ТП, осуществления стадии редактирования генома на активированных ТП и размножения ТП, подвергающихся редактированию генома согласно способам, описанным в настоящем документе.

[0265] Необходимо отметить, что альтернативные варианты осуществления способа размножения могут отличаться от способа, показанного выше; *например*, альтернативные варианты осуществления могут не иметь таких же стадий (a)-(g) или могут иметь иное количество стадий. Независимо от конкретного варианта осуществления, способ редактирования генома может осуществляться в любой момент времени в ходе способа

размножения ТП. Например, альтернативные варианты осуществления могут включать более двух заходов размножения, и возможно, чтобы редактирование генома осуществлялось на ТП в ходе третьего или четвертого размножения, и тому подобное.

[0266] Согласно одному из вариантов осуществления, способ редактирования генома осуществляется на ТП из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции. Например, редактирование генома может осуществляться на первой популяции ТП или на части ТП, собранных из первой популяции, и после способа редактирования генома эти ТП могут впоследствии помещаться обратно в способ размножения (*например*, обратно в среду для культивирования). Альтернативно, редактирование генома может осуществляться на ТП от второй или третьей популяции или на части ТП, собранных от второй или третьей популяции, соответственно, и после способа редактирования генома эти ТП могут впоследствии помещаться обратно в способ размножения (*например*, обратно в среду для культивирования). Согласно другому варианту осуществления, редактирование генома осуществляется, когда ТП по-прежнему находятся в среде для культивирования и когда осуществляется размножение, *то есть*, они не обязательно “удаляются” из размножения для осуществления редактирования генома.

[0267] Согласно другому варианту осуществления, способ редактирования генома осуществляется на ТП от первого размножения или ТП от второго размножения, или как от того, так и от другого. Например, в ходе первого размножения или второго размножения, редактирование генома может осуществляться на ТП, которые собирают из среды для культивирования, и после способа редактирования генома эти ТП могут впоследствии помещаться обратно в способ размножения, *например*, вводиться обратно в среду для культивирования.

[0268] Согласно другому варианту осуществления, способ редактирования генома осуществляется, по меньшей мере, на части ТП после первого размножения и до второго размножения. Например, после первого размножения, редактирование генома может осуществляться на ТП, которые отбирают из среды для культивирования, и после способа редактирования генома эти ТП могут впоследствии помещаться обратно в способ размножения, *например*, вводиться обратно в среду для культивирования для второго размножения.

[0269] Согласно альтернативным вариантам осуществления, способ редактирования генома осуществляется до стадии (с) (*например*, до, в ходе или после любой из стадий (а)-(b)), до стадии (d) (*например*, до, в ходе или после любой из стадий (а)-(с)), до стадии (е) (*например*, до, в ходе или после любой из стадий (а)-(d)), или до стадии (f) (*например*, до, в ходе или после любой из стадий (а)-(е)).

[0270] Необходимо отметить относительно ОКТ-3, согласно определенным вариантам осуществления, что среда для культивирования клеток может содержать ОКТ-3, начиная со дня начала (День 0), или Дня 1 первого размножения, так что редактирование генома осуществляется на ТП после того, как они экспонируются для ОКТ-3 в среде для

культивирования клеток в День 0 и/или День 1. Согласно другому варианту осуществления, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток. Альтернативно, среда для культивирования клеток может содержать ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

[0271] Также необходимо отметить относительно агониста 4-1BB, согласно определенным вариантам осуществления, что среда для культивирования клеток может содержать агонист 4-1BB, начиная со дня начала (День 0) или Дня 1 первого размножения, так что редактирование генома осуществляется на ТП после того, как они экспонируются для агониста 4-1BB в среде для культивирования клеток в День 0 и/или День 1. Согласно другому варианту осуществления, среда для культивирования клеток содержит агонист 4-1BB в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1BB вводится в среду для культивирования клеток. Альтернативно, среда для культивирования клеток может содержать агонист 4-1BB в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB вводится в среду для культивирования клеток.

[0272] Также необходимо отметить относительно IL-2, согласно определенным вариантам осуществления, что среда для культивирования клеток может содержать IL-2, начиная со дня начала (День 0) или Дня 1 первого размножения, так что редактирование генома осуществляется на ТП после того, как они экспонируются для IL-2 в среде для культивирования клеток в День 0 и/или День 1. Согласно другому варианту осуществления, среда для культивирования клеток содержит IL-2 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как IL-2 вводится в среду для культивирования клеток. Альтернативно, среда для культивирования клеток может содержать IL-2 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как IL-2 вводится в среду для культивирования клеток.

[0273] Как обсуждается выше, одно или несколько соединений из ОКТ-3, агонист 4-1BB и IL-2 могут включаться в среду для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1 первого размножения. Согласно одному из вариантов осуществления, ОКТ-3 включаются в среду для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1 первого размножения, и/или агонист 4-1BB включается в среду для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1 первого размножения, и/или IL-2 включается в среду для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1 первого размножения. Согласно одному примеру, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 и агонист 4-1BB, начиная со Дня 0 или Дня 1 первого размножения. Согласно другому примеру, среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, агонист 4-1BB и IL-2, начиная со Дня 0 или Дня

1 первого размножения. Разумеется, одно или несколько соединений из ОКТ-3, агонист 4-1BB и IL-2 могут добавляться в среду для культивирования клеток в одной или нескольких дополнительных временных точках в ходе способа размножения, как приведено в различных вариантах осуществления, описанных в настоящем документе.

[0274] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции TIL, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции TIL, где вторая популяция TIL, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция TIL, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции TIL, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции TIL в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции TIL дополнительным IL-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом OX40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции TIL, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL;

(i) перенос собранной популяции TIL в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции TIL, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида.

[0275] Согласно одному из вариантов осуществления, упомянутый выше способ

можно использовать для получения аутологичной собранной популяции ТП для лечения субъекта человека с раковым заболеванием.

С. Иммунные контрольные точки

[0276] Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, популяция ТП подвергается редактированию генома посредством генетической модификации генов одной или нескольких иммунных контрольных точек в популяции ТП. Говоря иначе, последовательность ДНК в ТП, которая кодирует одну или несколько иммунных контрольных точек ТП, постоянно модифицируется, *например*, инсерции, делеции или замены, в геноме ТП. Иммунные контрольные точки представляют собой молекулы, экспрессируемые лимфоцитами, которые регулируют иммунную реакцию посредством ингибиторных или стимуляторных путей. В случае рака, пути иммунных контрольных точек часто активируются для ингибирования противоопухолевой реакции, *то есть*, экспрессирование определенных иммунных контрольных точек злокачественными клетками ингибирует противоопухолевый иммунитет и облегчает рост раковых клеток. Смотри, *например*, Marin-Acevedo *et al.*, *Journal of Hematology & Oncology* (2018) 11:39. Таким образом, определенные ингибиторные молекулы контрольных точек служат в качестве мишеней для иммунотерапии по настоящему изобретению. Согласно конкретным вариантам осуществления, ТП подвергаются редактированию генома для блокировки или стимулирования определенных путей иммунных контрольных точек и повышения тем самым иммунологической активности организма против опухолей.

[0277] Как используется в настоящем документе, ген иммунной контрольной точки содержит последовательность ДНК, кодирующую молекулу иммунной контрольной точки. Согласно конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, редактирование генома ТП в ходе способа размножения ТП вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТП. Например, редактирование генома может вызывать экспрессирование ингибиторного рецептора, такого как PD-1 или CTLA-4, который должен быть молчащим или редуцированным для повышения иммунной реакции.

[0278] Наиболее широко исследованные контрольные точки включают рецептор-1 программируемой гибели клеток (PD-1) и цитотоксичную ассоциированную с Т лимфоцитом молекулу-4 (CTLA-4), которые представляют собой ингибиторные рецепторы на иммунных клетках, которые ингибируют ключевые эффекторные функции (*например*, активирование, пролиферацию, высвобождение цитокинов, цитотоксичность, и тому подобное), когда они взаимодействуют с ингибиторным лигандом. Многочисленные молекулы контрольных точек, в дополнение к PD-1 и CTLA-4, возникают как потенциальные мишени для иммунотерапии, как обсуждается более подробно ниже.

[0279] Неограничивающие примеры генов иммунных контрольных точек, которые могут быть молчащими или ингибированными посредством постоянного редактирования генома ТП по настоящему изобретению, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-

3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, BAFF (BR3), CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3. Например, гены иммунных контрольных точек, которые могут быть молчащими или ингибированными в ТИЛ по настоящему изобретению, могут выбираться из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, TIM-3, Cish, TGF β и PKA. BAFF (BR3) описывается в Bloom, *et al.*, *J. Immunother.*, 2018, in press. Согласно другому примеру, гены иммунных контрольных точек, которые могут быть молчащими или ингибированными в ТИЛ по настоящему изобретению, могут выбираться из группы, включающей PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) и их сочетания.

[0280] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ включает:

(a) получение первой популяции ТИЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТИЛ, где вторая популяция ТИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТИЛ, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТИЛ, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТИЛ в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТИЛ дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АПС), для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТИЛ, полученной на Стадии (g), для получения

собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) и их сочетания.

1. PD-1

[0281] Одна из наиболее изучаемых мишеней для введения блокады контрольной точки представляет собой рецептор программируемой гибели (PD1 или PD-1, также известный как PDCD1), элемент суперсемейства регуляторов Т-клеток CD28. Его лиганды, PD-L1 и PD-L2, экспрессируются в разнообразных опухолевых клетках, включая меланому. Взаимодействие PD-1 с PD-L1 ингибирует эффекторную функцию Т-клеток, давая в результате Т-клетки при настройках хронического стимулирования, и вызывает апоптоз Т-клеток в окружающей микросреде опухоли. PD1 может также играть роль в опухолевом специфичном уходе от иммунного надзора.

[0282] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование PD1 в ТП сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИ) в терапевтическую популяцию ТП может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТП посредством сайленсирования или подавления экспрессирования PD1. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, такой как PD1. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или редуцирования экспрессирования PD1 в ТП.

2. CTLA-4

[0283] Экспрессирование CTLA-4 индуцируется при активировании Т-клеток на активированных Т-клетках, и конкурирует за связывание с активирующими антигенами CD80 и CD86 антиген-презентирующих клеток. Взаимодействие CTLA-4 с CD80 или CD86 вызывает ингибирование Т-клеток и служит для поддержания баланса иммунной реакции. Однако, ингибирование взаимодействия CTLA-4 с CD80 или CD86 может пролонгировать

активирование Т-клеток и таким образом повысить уровень иммунной реакции на раковый антиген.

[0284] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование CTLA-4 в ТИЛ сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством сайленсирования или подавления экспрессирования CTLA-4. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, CTLA-4. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования CTLA-4 в ТИЛ.

3. LAG-3

[0285] Ген-3 активирования лимфоцитов (LAG-3, CD223) экспрессируется Т-клетками и природными клетками киллерами (NK) после лигирования с главным комплексом гистосовместимости (МНС) класса II. Хотя ее механизм остается неясным, его модуляция вызывает отрицательное регуляторное воздействие на функцию Т-клеток, предотвращая повреждение ткани и аутоиммунность. LAG-3 и PD-1 часто экспрессируются совместно и ап-регулируются на ТИЛ, приводя к иммунному истощению и росту опухоли. Таким образом, блокада LAG-3 улучшает противоопухолевые реакции. *Смотри, например, Marin-Acevedo et al., Journal of Hematology & Oncology (2018) 11:39.*

[0286] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование LAG-3 в ТИЛ сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством сайленсирования или подавления экспрессирования LAG-3. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, такого как LAG-3. Согласно конкретным вариантам осуществления, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования LAG-3 в ТИЛ.

4. TIM-3

[0287] Иммуноглобулин-3 Т-клеток (TIM-3) представляет собой прямой отрицательный регулятор Т-клеток и экспрессируется на NK клетках и макрофагах. TIM-3

косвенно способствует иммуноподавлению, вызывая размножение миелоидных супрессорных клеток (MDSC). Его уровни, как обнаружено, являются особенно повышенными на дисфункциональных и истощенных Т-клетках, говоря о важной роли в злокачественных новообразованиях.

[0288] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование TIM-3 в TIL сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части TIL посредством сайленсирования или подавления экспрессирования TIM-3. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, TIM-3. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования TIM-3 в TIL.

5. Cish

[0289] Cish, элемент супрессора семейства сигнальных цитокинов (SOCS) индуцируется посредством стимулирования TCR в Т-клетках CD8⁺ и ингибирует их функциональную avidность против опухолей. Генетическая делеция Cish в Т-клетках CD8⁺ может увеличить их размножение, функциональную avidность и полифункциональность цитокинов, давая в результате выраженное и продолжительное обращение развития установленных опухолей. *Смотри, например, Palmer et al., Journal of Experimental Medicine, 212 (12): 2095 (2015).*

[0290] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование Cish в TIL сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части TIL посредством сайленсирования или подавления экспрессирования Cish. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точке, например, Cish. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования Cish в TIL.

6. TGFβ

[0291] Путь передачи сигналов TGFβ имеет множество функций при регулировании

роста, дифференциации, апоптоза, подвижности и инвазии клеток при продуцировании внеклеточного матрикса, ангиогенезе и иммунной реакции. Дeregулирование передачи сигналов TGF β в опухолях является частым и играет критическую роль при зарождении, развитии и метастазировании опухолей. На уровне окружающей микросреды, путь TGF β вносит вклад в генерирование благоприятной окружающей микросреды для роста и метастазирования опухоли при канцерогенезе. *Смотри, например, Neuzillet et al., Pharmacology & Therapeutics, Vol. 147, pp. 22-31 (2015).*

[0292] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование TGF β в ТИЛ сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством сайленсирования или редуцирования экспрессирования TGF β . Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, TGF β . Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования TGF β в ТИЛ.

[0293] В некоторых вариантах осуществления, TGF β R2 (бета-рецептор TGF 2) может подавляться посредством сайленсирования TGF β R2, используя системы CRISPR/Cas9 или посредством использования доминантной отрицательной внеклеточной ловушки TGF β R2, используя способы, известные в данной области.

7. PKA

[0294] Протеинкиназа А (PKA) представляет собой хорошо известный элемент суперсемейства серинтреонинпротеинкиназ. PKA, известная также как сАМР-зависимая протеинкиназа, представляет собой состоящую из множества единиц протеинкиназу, которая медирует передачу сигналов рецепторов, связанных с G-белком, посредством ее активирования при связывании с сАМР. Она вовлечена в контроль большого количества клеточных процессов от метаболизма до активирования ионных каналов, роста и дифференциации клеток, экспрессирования гена и апоптоза. Важно, что PKA участвует в зарождении и иницировании множества опухолей. *Смотри, например, Sapio et al., EXCLI Journal; 2014; 13: 843–855.*

[0295] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование PKA в ТИЛ сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ

включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством сайленсирования или подавления экспрессирования РКА. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, РКА. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ может использоваться для сайленсирования или подавления экспрессирования РКА в ТИЛ.

8. CBLB

[0296] CBLB (или CBL-B) представляет собой E3 убикитинпротеинлигазу и является отрицательным регулятором активирования Т-клеток. Bachmaier, *et al.*, *Nature*, 2000, 403, 211–216; Wallner, *et al.*, *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 692639.

[0297] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование CBLB в ТИЛ сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством сайленсирования или подавления экспрессирования CBLB. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, CBLB. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования РКА в ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления, CBLB включается, используя нокаут TALEN. В некоторых вариантах осуществления, CBLB включается, используя нокин транскрипционного ингибитора TALE-KRAB. Дополнительные подробности этих способов можно найти в Boettcher и McManus, *Mol. Cell Обзор*, 2015, 58, 575-585.

9. TIGIT

[0298] Иммунорецептор Т-клетки с доменом Ig и ITIM (ингибиторным мотивом на основе иммунорецептора тирозина) или TIGIT представляет собой трансмембранный гликопротеиновый рецептор с Ig-подобным доменом V-типа и ITIM в своем цитоплазматическом домене. Khalil, *et al.*, *Advances in Cancer Research*, 2015, 128, 1-68; Yu, *et al.*, *Nature Immunology*, 2009, Volume. 10, No. 1, 48-57. TIGIT экспрессируется некоторыми Т-клетками и природными клетками киллерами. В дополнение к этому, TIGIT, как показано, сверхэкспрессируется на антиген-специфичных Т-клетках CD8⁺ и ТИЛ CD8⁺, в особенности, у индивидуумов с меланомой. Исследования показывают, что путь TIGIT вносит вклад в иммунную эвазию в опухоль, и ингибирование TIGIT, как показано, увеличивает активирование и пролиферацию Т-клеток в ответ на поликлональное и антиген-специфичное стимулирование. Khalil, *et al.*, *Advances in Cancer Research*, 2015, 128,

1-68. Кроме того, совместная блокада TIGIT с помощью либо PD-1, либо TIM3 демонстрирует синергические воздействия против твердых опухолей на моделях мышей. *Id.*; смотри также Kurtulus, *et al.*, *The Journal of Clinical Investigation*, 2015, Vol. 125, No. 11, 4053-4062.

[0299] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование TIGIT в TIL сайленсируется или редуцируется в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2A или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части TIL посредством сайленсирования или подавления экспрессирования TIGIT. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена иммунной контрольной точки, например, TIGIT. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для сайленсирования или подавления экспрессирования TIGIT в TIL.

D. Сверхэкспрессирование костимуляторных рецепторов или молекул адгезии

[0300] Согласно дополнительным вариантам осуществления, редактирование генома TIL в ходе способа размножения TIL вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL. Например, редактирование генома может вызывать увеличение экспрессирования стимуляторного рецептора, это означает, что он сверхэкспрессируется по сравнению с экспрессированием стимуляторного рецептора, который не модифицируется генетически. Неограничивающие примеры генов иммунных контрольных точек, которые могут демонстрировать увеличение экспрессирования посредством постоянного редактирования генома TIL по настоящему изобретению, включают определенные рецепторы хемокинов и интерлейкины, такие как CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

1. CCR

[0301] Чтобы адоптивная Т-клеточная иммунотерапия была эффективной, Т-клетки должны доставляться в опухоли хемокинами с помощью направленной миграции. Согласованность между хемокинами, секретируемыми клетками опухоли, хемокинами, присутствующими на периферии и рецепторами хемокинами, экспрессируемыми Т-клетками, является важной для успешной направленной миграции Т-клеток в ложе опухоли.

[0302] Согласно конкретным вариантам осуществления, способы редактирования генома по настоящему изобретению можно использовать для увеличения экспрессирования определенных рецепторов хемокинов в TIL, таких как один или несколько рецепторов из

CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и CX3CR1. Сверхэкспрессирование CCR может помочь содействовать эффекторной функции и пролиферации ТИЛ после адоптивного переноса.

[0303] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование одного или нескольких соединений из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и CX3CR1 в ТИЛ усиливается в соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством усиления экспрессирования одного или нескольких из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3 и CX3CR1. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена рецептора хемокина. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для повышения экспрессирования определенных рецепторов хемокинов в ТИЛ.

[0304] В одном из вариантов осуществления, молекулы адгезии CCR4 и/или CCR5 вставляются в популяцию ТИЛ, используя гамма-ретровирусный или лентивирусный метод, как описано в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления, молекулы адгезии CXCR2 вставляются в популяцию ТИЛ, используя гамма-ретровирусный или лентивирусный метод, как описано в Forget, *et al.*, *Frontiers Immunology* 2017, 8, 908 или Peng, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2010, 16, 5458, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0305] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ включает:

(а) получение первой популяции ТИЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и необязательно содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТИЛ, где вторая популяция ТИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТИЛ, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй

популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней, для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1 и, необязательно, LAG-3, и где дополнительно молекула адгезии CXCR2 вставляется посредством гамма-ретровирусного или лентивирусного метода в первую популяцию ТП, вторую популяцию ТП или собранную популяцию ТП.

[0306] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до

стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1 и, необязательно, LAG-3, и при этом молекулы адгезии CCR4 и/или CCR5 вставляются дополнительно посредством гамма-ретровирусного или лентивирусного метода в первую популяцию ТП, вторую популяцию ТП или собранную популяцию ТП.

[0307] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно

1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным IL-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1 и, необязательно, LAG-3, и где дополнительно молекулы адгезии, выбранные из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их сочетания, вставляются посредством гамма-ретровирусного или лентивирусного метода в первую популяцию ТП, вторую популяцию ТП или собранную популяцию ТП.

2. Интерлейкины

[0308] Согласно дополнительным вариантам осуществления, способы редактирования генома по настоящему изобретению можно использовать для повышения экспрессирования определенных интерлейкинов, таких как один или несколько белков из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 и IL-21. Определенные интерлейкины, как продемонстрировано, увеличивают эффекторные функции Т-клеток и медируют контроль опухоли.

[0309] Согласно конкретным вариантам осуществления, экспрессирование одного или нескольких интерлейкинов из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15 и IL-21 в ТП повышается в

соответствии с композициями и способами по настоящему изобретению. Например, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А или способов, показанных на Фигурах 20 и 21), где способ включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ посредством усиления экспрессирования одного или нескольких интерлейкинов из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, и IL-21. Как описано более подробно ниже, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва гена интерлейкина. Например, способ CRISPR, способ TALE или цинк-пальцевый способ можно использовать для повышения экспрессирования определенных интерлейкинов в ТИЛ.

[0310] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ включает:

(а) получение первой популяции ТИЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и необязательно содержащей антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТИЛ, где вторая популяция ТИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТИЛ, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТИЛ, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТИЛ в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТИЛ дополнительным IL-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТИЛ, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТИЛ, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без

открывания системы, где собранная популяция ТПЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТПЛ;

(i) перенос собранной популяции ТПЛ в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТПЛ, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1 и, необязательно, LAG-3, и где, дополнительно, интерлейкин, выбранный из группы, состоящей из IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, и их сочетания, вставляется посредством гамма-ретровирусного или лентивирусного метода в первую популяцию ТПЛ, вторую популяцию ТПЛ или собранную популяцию ТПЛ.

Е. Способы редактирования генома

[0311] Как обсуждается выше, варианты осуществления настоящего изобретения предлагают инфильтрующие опухоль лимфоциты (ТПЛ), которые генетически модифицируются посредством редактирования генома для повышения их терапевтического воздействия. Варианты осуществления настоящего изобретения охватывают редактирование генома посредством вставки нуклеотидов (РНК или ДНК) в популяцию ТПЛ, как для ускорения экспрессирования одного или нескольких белков, так и ингибирования экспрессирования одного или нескольких белков, а также их сочетаний. Варианты осуществления настоящего изобретения также предлагают способы размножения ТПЛ в терапевтическую популяцию, где способы включают редактирование генома ТПЛ. Имеется несколько технологий редактирования генома, которые можно использовать для генетической модификации популяции ТПЛ, которые являются пригодными для использования по настоящему изобретению.

[0312] В некоторых вариантах осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию стабильного инкорпорирования генов для продуцирования одного или нескольких белков. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию ретровирусной трансдукции. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области и описываются, *например*, в Levine, *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 2006, 103, 17372-77; Zufferey, *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 1997, 15, 871-75; Dull, *et al.*, *J. Virology* 1998, 72, 8463-71 и в патенте США № 6627442, описания каждого из них включается в качестве ссылки в настоящий документ. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию гамма-ретровирусной трансдукции. Системы гамма-ретровирусной трансдукции известны в данной области и описываются, *например*, Серко и Pear, *Cur. Prot. Mol. Biol.* 1996, 9.9.1-9.9.16, описание которой включается в качестве ссылки в настоящий документ. В одном из

вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию транспозон-медируемого переноса гена. Системы транспозон-медируемого переноса гена известны в данной области и включают системы, где транспозаза получается, как вектор экспрессии ДНК или как экспрессируемая РНК, или белок, так что долговременное экспрессирование транспозазы не происходит в трансгенных клетках, например, транспозазы, получаемой как mRNA (*например*, mRNA, содержащей кэп и поли-А хвост). Соответствующие системы транспозон-медируемого переноса гена, включая Tel-подобную транспозазу сальмонидного типа (транспозаза SB или Sleeping Beauty), такую как SB10, SB11, и SB100х, и генно-инженерные ферменты с повышенной ферментативной активностью, описываются, *например*, в Hackett, *et al.*, *Mol. Therapy* 2010, 18, 674-83 и в патенте США № 6489458, описания каждого из которых включается в качестве ссылок в настоящий документ.

[0313] В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию стабильного инкорпорирования генов для продуцирования или ингибирования (*например*, сайленсирования) одного или нескольких белков. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТПЛ включает стадию электропорообразования. Способы электропорообразования известны в данной области и описываются, *например*, в Tsong, *Biophys. J.* 1991, 60, 297-306, и в публикации заявки на патент США № 2014/0227237 A1, описание каждого из которых включается в качестве ссылки в настоящий документ. Можно использовать другие способы электропорообразования, известные в данной области, такие как те, которые описаны в патентах США №№ 5019034; 5128257; 5137817; 5173158; 5232856; 5273525; 5304120; 5318514; 6010613 и 6078490, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ стерильного электропорообразования. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования, включающий стадии обработки ТПЛ импульсными электрическими полями для изменения, манипуляции или для того, чтобы вызвать определенные и контролируемые постоянные или временные изменения в ТПЛ, включающий стадию приложения последовательности, по меньшей мере, из трех отдельных, контролируемых оператором, независимо программируемых, электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженность поля равную или большую чем 100 V/см, к ТПЛ, где последовательность, по меньшей мере, трех электрических импульсов постоянного тока имеет одну, две или три из следующих характеристик: (1) по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов отличаются друг от друга по амплитуде импульсов; (2) по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов различаются по ширине импульса; и (3) первый интервал между импульсами для первого набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами

для второго набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования, включающий стадии обработки ТП импульсными электрическими полями для изменения, манипуляций или для того, чтобы вызвать определенные и контролируемые, постоянные или временные изменения в ТП, включающий стадию приложения последовательности, по меньшей мере, из трех отдельных, контролируемых оператором независимо программируемых, электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженность поля равную или большую чем 100 V/см, к ТП, где по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов отличаются друг от друга по амплитуде импульса. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования, включающий стадии обработки ТП импульсными электрическими полями для изменения, манипуляций или для того, чтобы вызвать определенные и контролируемые, постоянные или временные изменения в ТП, включающий стадию приложения последовательности, по меньшей мере, из трех отдельных, контролируемых оператором независимо программируемых, электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженность поля равную или большую чем 100 V/см, к ТП, где по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов отличаются друг от друга по ширине импульса. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования, включающий стадии обработки ТП импульсными электрическими полями для изменения, манипуляций или для того, чтобы вызвать определенные и контролируемые, постоянные или временные изменения в ТП, включающий стадию приложения последовательности, по меньшей мере, из трех отдельных, контролируемых оператором независимо программируемых, электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженность поля равную или большую чем 100 V/см, к ТП, где первый интервал между импульсами для первого набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами для второго набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов. В одном из вариантов осуществления, способ электропорообразования представляет собой способ импульсного электропорообразования, включающий стадии обработки ТП импульсными электрическими полями, чтобы вызвать образование пор в ТП, включающий стадию приложения последовательности, по меньшей мере, из трех электрических импульсов постоянного тока, имеющих напряженность поля равную или большую чем 100 V/см, к ТП, где последовательность, по меньшей мере, из трех электрических импульсов постоянного тока имеет одну, две или три из следующих характеристик: (1) по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов отличаются друг от друга по амплитуде импульса; (2) по меньшей мере, два, по меньшей мере, из трех импульсов отличаются друг от друга по ширине импульса; и (3) первый интервал между импульсами для первого набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов отличается от второго интервала между импульсами

для второго набора из двух, по меньшей мере, из трех импульсов так, что индуцированные поры поддерживаются в течение относительно большого периода времени, и так что поддерживается жизнеспособность ТП. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТП включает стадию трансфицирования фосфатом кальция. Методы трансфицирования фосфатом кальция (кальций-фосфатная преципитация ДНК, поверхностное покрытие клеток, и эндоцитоз) известны в данной области и описываются в Graham and van der Eb, *Virology* 1973, 52, 456-467; Wigler, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 1373-1376; и Chen and Okayarea, *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2745-2752; и в патенте США № 5593875, описания каждого из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТП включает стадию липосомального трансфицирования. Методы липосомального трансфицирования, такие как методы, которые используют липосомальный препарат 1:1 (масс/масс) катионного липида *N*-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-*n,n,n*-триметиламмонийхлорида (DOTMA) и диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в фильтрованной воде, известны в данной области и описываются в Rose, *et al.*, *Biotechniques* 1991, 10, 520-525 и Felgner, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417 и в патентах США №№ 5279833; 5908635; 6056938; 6110490; 6534484; и 7687070, описание каждого из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. В одном из вариантов осуществления, способ генетической модификации популяции ТП включает стадию трансфицирования используя способы, описанных в патентах США №№ 5766902; 6025337; 6410517; 6475994; и 7189705; описание каждого из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки.

[0314] Согласно одному из вариантов осуществления, способ редактирования генома может включать использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в одном или нескольких генах иммунных контрольных точек. Такие программируемые нуклеазы делают возможным прецизионное редактирование генома посредством введения разрыва в конкретных геномных локусах, *то есть*, они основываются на распознавании конкретной последовательности ДНК в геноме для нацеливания домена нуклеазы на это положение и для медиирования генерирования двухнитевого разрыва в целевой последовательности. Двухнитевый разрыв в ДНК впоследствии рекрутирует эндогенный механизм репарации в месте разрыва для медиирования редактирования генома либо посредством соединения негомологичных концов (NHEJ), либо посредством гомологично направленной репарации (HDR). Таким образом, репарация разрыва может давать в результате введение инсерционных/делеционных мутаций, которые разрушают (*например*, включают, подавляют или увеличивают) целевой продукт гена.

[0315] Главные классы нуклеаз, которые разработаны, чтобы сделать возможным сайт-специфичное редактирование генома, включают цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), нуклеазы подобные активаторам транскрипции (TALEN) и CRISPR-ассоциированные нуклеазы (*например*, CRISPR/Cas9). Эти системы нуклеаз могут в широком смысле

классифицироваться на две категории на основе их режима распознавания ДНК: ZFN и TALEN достигают специфичного связывания ДНК посредством взаимодействия белок-ДНК, в то время как системы CRISPR, такие как Cas9, нацелены на конкретные последовательности ДНК с помощью короткой направляющей молекулы РНК, у которой пары оснований взаимодействуют непосредственно с целевой ДНК и посредством взаимодействий белок-ДНК. Смотри, *например*, Cox *et al.*, *Nature Medicine*, 2015, Vol. 21, No. 2.

[0316] Неограничивающие примеры способов редактирования генома, которые можно использовать в соответствии со способами размножения ТПЛ по настоящему изобретению, включают способы CRISPR, способы TALE и способы ZFN, варианты осуществления которых описаны более подробно ниже. Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения ТПЛ в терапевтическую популяцию может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А) или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТПЛ с помощью одного или нескольких способов из способа CRISPR, способа TALE или способа ZFN для генерирования ТПЛ, которые могут обеспечить улучшенное терапевтическое воздействие. Согласно одному из вариантов осуществления ТПЛ, подвергающиеся редактированию генома, можно оценивать на улучшенное терапевтическое воздействие посредством их сравнения с немодифицированными ТПЛ *in vitro*, *например*, оценивая *in vitro* эффекторную функцию, профили цитокинов, и тому подобное, по сравнению с немодифицированными ТПЛ.

[0317] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, электропорообразование используют для доставки систем редактирования генома, таких как системы CRISPR, TALEN и ZFN. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система электропорообразования представляет собой проточную систему электропорообразования. Пример соответствующей проточной системы электропорообразования пригодной для использования с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения представляет собой коммерчески доступную систему MaxCyte STX. Имеется несколько альтернативных коммерчески доступных инструментов электропорообразования, которые могут быть пригодными для использования вместе с настоящим изобретением, такие как система AgilePulse или ECM 830 доступная от BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Celectricon), Nucleofector (Lonza/Amaha), GenePulser MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) или siPORTer96 (Ambion). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система электропорообразования формирует замкнутую стерильную систему вместе с остальной частью способа размножения ТПЛ. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, система электропорообразования представляет собой импульсную систему электропорообразования, как описано в настоящем документе, и формирует замкнутую, стерильную систему вместе с остальной частью способа размножения ТПЛ.

1. Способы CRISPR

[0318] Способ размножения ТИЛ в терапевтическую популяцию можно осуществлять согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2A), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ с помощью способа CRISPR (например, CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1). Согласно конкретным вариантам осуществления, использование способа CRISPR в ходе способа размножения ТИЛ вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТИЛ. Альтернативно, использование способа CRISPR в ходе способа размножения ТИЛ вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТИЛ.

[0319] CRISPR маркирует “короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами”. Способ использования системы CRISPR для редактирования генома также упоминается в настоящем документе как способ CRISPR. Системы CRISPR можно разделить на два главных класса, Класс 1 и Класс 2, которые дополнительно классифицируются на различные типы и субтипы. Классификация систем CRISPR основывается на эффекторных белках Cas, которые могут расщеплять конкретные нуклеиновые кислоты. В Классе 1 систем CRISPR эффекторный модуль состоит из мультипротеинового комплекса, в то время как системы Класса 2 используют только один эффекторный белок. Класс 1 CRISPR включает Типы I, III и IV, а Класс 2 CRISPR включает Типы II, V и VI. Хотя любой из этих типов систем CRISPR можно использовать согласно настоящему изобретению, имеются три типа систем CRISPR, которые включают РНК и белки Cas, которые являются предпочтительными по настоящему изобретению: Типы I (иллюстрируется Cas3), II (иллюстрируется Cas9) и III (иллюстрируется Cas10). Тип II CRISPR представляют собой одну из наиболее полно охарактеризованных систем.

[0320] Технология CRISPR адаптирована из природных механизмов защиты бактерий и археев (домен одноклеточных микроорганизмов). Эти организмы используют РНК, полученную от CRISPR, и различные белки Cas, включая Cas9, для противодействия атакам вирусов и других чужеродных организмов посредством измельчения и разрушения ДНК чужеродного захватчика. CRISPR представляет собой специализированную область ДНК с двумя различными характеристиками: присутствие нуклеотидных повторов и спейсеров. Повторяющиеся последовательности нуклеотидов распределяются в области CRISPR вместе с короткими сегментами чужеродной ДНК (спейсерами), расположенными между повторяющимися последовательностями. В системе тип II CRISPR/Cas, спейсеры встраиваются в геномные локусы CRISPR и транскрибируются и процессируются в короткие РНК CRISPR (crRNA). Эти crRNA ренатурируются для транс-активирования crRNA (tracrRNA) и непосредственной последовательность-специфичного расщепления и

сайленсирования патогенных ДНК с помощью белков Cas. Распознавание мишени белком Cas9 требует “затравочной” последовательности в crRNA и последовательности мотива (PAM) рядом с содержащим консервативные динуклеотиды протоспейсером перед crRNA-связывающей областью. Система CRISPR/Cas может при этом перенацеливаться для расщепления по существу любой последовательности ДНК посредством реконструирования crRNA. Таким образом, согласно определенным вариантам осуществления, Cas9 служит в качестве РНК-направляющей ДНК эндонуклеазы, которая расщепляет ДНК при распознавании crRNA-tracrRNA. CrRNA и tracrRNA в нативной системе могут упрощаться в виде одной направляющей РНК (sgRNA) приблизительно из 100 нуклеотидов для использования в генной инженерии. sgRNA представляет собой синтетическую РНК, которая содержит каркасную последовательность необходимую для связывания Cas и определяемый пользователем спейсер приблизительно из 17-20-нуклеотидов, который определяет геномную мишень для модификации. Таким образом, пользователь может изменять геномную мишень белка Cas посредством изменения целевой последовательности, присутствующей в sgRNA. Система CRISPR/Cas может прямо переноситься в клетки человека посредством совместной доставки плазмид, экспрессирующих эндо-нуклеазу Cas9, и компонентов РНК (например, sgRNA). Различные варианты белков Cas можно использовать для уменьшения ограничений нацеливания (например, ортологи Cas9, такие как Cpf1).

[0321] Согласно одному из вариантов осуществления, генно-инженерная, программируемая, не встречающаяся в природе система CRISPR-Cas Типа II содержит белок Cas9 и, по меньшей мере, одну направляющую РНК, которая нацеливает и гибридизирует целевую последовательность молекулы ДНК в TIL, где молекула ДНК кодирует, а TIL экспрессирует, по меньшей мере, одну молекулу иммунной контрольной точки, а белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, тем самым изменяя экспрессирование, по меньшей мере, одной молекулы иммунной контрольной точки; и, где белок Cas9 и направляющая РНК не встречаются вместе в природе. Согласно одному из вариантов осуществления, экспрессирование двух или более молекул иммунных контрольных точек изменяется. Согласно одному из вариантов осуществления, направляющая (направляющие) РНК содержит направляющую последовательность, слитую с последовательностью tracr. Например, направляющая РНК может содержать crRNA-tracrRNA или sgRNA. Согласно аспектам настоящего изобретения, термины “направляющая РНК”, “отдельная направляющая РНК” и “синтетическая направляющая РНК” можно использовать взаимозаменяемо, и они относятся к полинуклеотидной последовательности, содержащей направляющую последовательность, которая представляет собой последовательность приблизительно из 17-20 bp в направляющей РНК, которая определяет целевой сайт.

[0322] Варианты Cas9, имеющие улучшенную специфичность на мишени по сравнению с Cas9, также можно использовать в соответствии с вариантами осуществления настоящего изобретения. Такие варианты могут упоминаться как высокоточные Cas-9s. Согласно одному из вариантов осуществления, можно использовать подход с двойной

никазой, где две никазы, нацеленные на противоположные нити ДНК, генерируют DSB в целевой ДНК (часто упоминается как двойной ник или система CRISPR с двойной никазой). Например, этот подход может включать мутацию одного из двух доменов нуклеазы Cas9, превращающую Cas9 нуклеазу в никазу. Неограничивающие примеры высокоточных Cas9s включают eSpCas9, SpCas9-HF1 и HypaCas9. Такие варианты могут уменьшить или устранить нежелательные изменения в нецелевых сайтах ДНК. Смотри, *например*, Slaymaker IM, et al. *Science*. 2015 Dec 1, Kleinstiver BP, et al. *Nature*. 2016 Jan 6, и Ran et al., *Nat Protoc*. 2013 Nov; 8(11):2281-2308, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0323] В дополнение к этому, согласно конкретным вариантам осуществления, можно использовать каркасы Cas9, это улучшает доставку гена Cas9 в клетки и улучшает специфичность на мишени, например, как описано в публикации заявки на патент США № 2016/0102324, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки. Например, каркасы Cas9 могут содержать мотив RuvC, как определено (D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A) и/или мотив HNH, определенный (Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S), где X представляет собой любую из 20 встречающихся в природе аминокислот, а [I/L] представляет собой изолейцин или лейцин. Домен HNH ответствен за никование одной нити целевой dsDNA, а домен RuvC вовлечен в расщепление другой нити dsDNA. Таким образом, каждый из этих доменов никует нить целевой ДНК в протоспейсере в непосредственной близости от PAM, что приводит к тупому расщеплению ДНК. Эти мотивы могут объединяться друг с другом для создания более компактных и/или более специфичных каркасов Cas9. Кроме того, мотивы можно использовать для создания разделенного белка Cas9 (например, редуцированной или усеченной формы белка Cas9 или варианта Cas9, который содержит либо домен RuvC, либо домен HNH), который разделен на два отдельных домена RuvC и HNH, которые могут процессировать целевую ДНК вместе или раздельно.

[0324] Согласно конкретным вариантам осуществления, способ CRISPR включает сайленсирование или редуцирование экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек в TIL посредством введения нуклеазы Cas9 и направляющей РНК (например, crRNA-tracrRNA или sgRNA), содержащей последовательность приблизительно из 17-20 нуклеотидов специфичных к последовательности целевой ДНК гена (генов) иммунной контрольной точки. Направляющая РНК может доставляться как РНК или посредством преобразования плазмиды с помощью кодирующей последовательности направляющей РНК под действием промотора. Ферменты CRISPR/Cas вводят двухнитевый разрыв (DSB) в конкретном положении на основе целевой последовательности, определенной sgRNA. DSB могут репарироваться в клетках посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), механизма, который часто вызывает инсерции или делеции (indels) в ДНК. Indels часто приводят к сдвигу рамки, вызывая потери функциональных аллелей; например, вызывая появление незрелых стоп-кодонов в открытой рамке считывания (ORF) целевого гена. Согласно определенным

вариантам осуществления, результат представляет собой мутацию с потерей функции в целевом гене иммунной контрольной точки.

[0325] Альтернативно, DSB, вызываемые ферментами CRISPR/Cas, могут репарироваться посредством гомологично-направленной репарации (HDR) вместо NHEJ. В то время как NHEJ-медируемая DSB репарация часто разрушает рамку открытого считывания гена, гомологично направленная репарация (HDR) может использоваться для генерирования конкретных изменений нуклеотидов в пределах от одного нуклеотида до больших инсерций. Согласно одному из вариантов осуществления, HDR используется для генов иммунных контрольных точек с целью редактирования генома посредством доставки шаблона репарации ДНК, содержащего желаемую последовательность, в TIL с помощью sgRNA(s) и Cas9 или никазы Cas9. Шаблон репарации предпочтительно содержит желаемое редактирование, а также дополнительную гомологичную последовательность непосредственно до и после целевого гена (часто упоминаемую как левая и правая гомологичные руки).

[0326] Согласно конкретным вариантам осуществления, ферментативно неактивная версия Cas9 (deadCas9 или dCas9) может нацеливаться на сайты начала транскрипции для подавления транскрипции посредством блокирования инициирования. Таким образом, целевые гены иммунных контрольных точек могут подавляться без использования DSB. Молекула dCas9 сохраняет способность к связыванию с целевой ДНК на основе нацеливающей последовательности sgRNA. Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ CRISPR включает сайленсирование или редуцирование экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек посредством ингибирования или предотвращения транскрипции целевого гена (генов). Например, способ CRISPR может включать слияние домена репрессора транскрипции, такого как домен Круппель-ассоциированного бокса (KRAB), с ферментативно неактивной версией Cas9, с образованием при этом, *например*, dCas9-KRAB, который нацелен на сайт начала транскрипции гена иммунной контрольной точки, что приводит к ингибированию или предотвращению транскрипции гена. Предпочтительно, репрессорный домен нацелен на окно после сайта начала транскрипции, *например*, примерно через 500 bp после него. Этот подход, который может упоминаться как интерференция CRISPR (CRISPRi), приводит к стойкому нокдауну гена посредством транскрипционного редуцирования целевой РНК.

[0327] Согласно конкретным вариантам осуществления, ферментативно неактивная версия Cas9 (deadCas9 или dCas9) может нацеливаться на сайты начала транскрипции для активирования транскрипции. Этот подход может упоминаться как активирование CRISPR (CRISPRa). Согласно одному из вариантов осуществления, способ CRISPR включает увеличение экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек посредством активирования транскрипции целевого гена (генов). Согласно таким вариантам осуществления, целевые гены иммунных контрольных точек могут активироваться без использования DSB. Способ CRISPR может включать нацеливание доменов транскрипционного активирования на сайт начала транскрипции; *например*,

посредством слияния транскрипционного активатора, такого как VP64, с dCas9, с образованием при этом, *например*, dCas9-VP64, который нацелен на сайт начала транскрипции гена иммунной контрольной точки, что приводит к активированию транскрипции гена. Предпочтительно, активаторный домен нацелен на окно перед сайтом начала транскрипции, *например*, примерно за 50-400 bp до него.

[0328] Дополнительные варианты осуществления настоящего изобретения могут использовать стратегии активирования, которые разработаны для сильнодействующего активирования целевых генов в клетках млекопитающих. Неограничивающие примеры включают совместное экспрессирование эпитопно-меченного dCas9 и эффекторных белков активаторных антител (*например*, системы SunTag), dCas9 слитого последовательно со множеством различных доменов активирования (*например*, dCas9-VPR) или совместного экспрессирования dCas9-VP64 с модифицированной каркасной gRNA и дополнительными РНК-связывающими хелперными активаторами (*например*, активаторами SAM).

[0329] Согласно другим вариантам осуществления, медируемый CRISPR способ редактирования генома, упоминаемый как рациональная геновая инженерия белков с помощью CRISPR (CARPE), может использоваться согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, как описано в патенте США № 9982278, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. CARPE включает генерирование “донорных” библиотек и библиотек “назначения”, которые включают направленные мутации из кассет редактирования однострессовой ДНК (ssDNA) или двухстрессовой ДНК (dsDNA) непосредственно в геноме. Конструирование донорной библиотеки включает преобразование рационально сконструированных олигонуклеотидов для редактирования в клетках с помощью направляющей РНК (gRNA), которая гибридизируется с целевой последовательностью ДНК. Олигонуклеотиды редактирования конструируются для спаривания делеции или мутации PAM с мутацией одного или нескольких желаемых кодонов в соседнем гене. Это делает возможным генерирование всей донорной библиотеки за одно преобразование. Донорная библиотека восстанавливается посредством амплификации рекомбинантных хромосом, например, с помощью реакции PCR, используя особенность синтеза от олигонуклеотида редактирования, а именно, вторую делецию или мутацию PAM, которая одновременно вводится на 3' окончании гена. Это ковалентно связывает целевые мутации кодона, направленные на делецию PAM. Затем донорные библиотеки совместно преобразуются в клетках с помощью вектора назначения gRNA для создания популяции клеток, которые экспрессируют библиотеку рационально сконструированных белков.

[0330] Согласно другим вариантам осуществления, способы отслеживаемого, прецизионного редактирования генома используя CRISPR-медируемые системы, упоминаемые как Genome Engineering by Trackable CRISPR Enriched Recombineering (GEN-TRA CER) можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, как описано в патенте США № 9982278, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. Способы GEN-TRA CER и векторы объединяют кассету редактирования с

gRNA, кодирующей ген, в один вектор. Кассета содержит желаемую мутацию и мутацию PAM. Вектор, который может также кодировать Cas9, вводится в клетку или популяцию клеток. Это активирует экспрессирование системы CRISPR в клетке или популяции клеток, заставляя gRNA рекрутировать Cas9 в целевую область, где происходит разрыв dsDNA, делая возможным встраивание мутации PAM.

[0331] Неограничивающие примеры генов, которые могут сайленсироваться или ингибироваться посредством TIL, подвергающихся постоянному редактированию генома с помощью способа CRISPR, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[0332] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены посредством постоянного редактирования генома TIL с помощью способа CRISPR, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0333] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессирования последовательности целевого гена с помощью способа CRISPR, которые можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, описаны в патентах США №№ 8697359; 8993233; 8795965; 8771945; 8889356; 8865406; 8999641; 8945839; 8932814; 8871445; 8906616; и 8895308, которые включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Ресурсы для осуществления способов CRISPR, такие как плазмиды для экспрессирования CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, являются коммерчески доступными от компаний, таких как GenScript.

[0334] В одном из вариантов осуществления, генетические модификации популяций TIL, как описано в настоящем документе, можно осуществлять используя системы CRISPR/Cpf1, как описано в патенте США № 9790490, описание которого включается в настоящий документ в качестве ссылки. Система CRISPR/Cpf1 является функционально отличной от системы CRISPR-Cas9 тем, что матрицы Cpf1-ассоциированного CRISPR процессируются в зрелые crRNA без необходимости в дополнительной tracrRNA. CrRNA, используемые в системе CRISPR/Cpf1, содержат спейсерную или направляющую последовательность и последовательность прямых повторов. Комплекс Cpf1p-crRNA, который образуется, используя этот способ, является достаточным сам по себе для расщепления целевой ДНК.

[0335] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает:

(а) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/Cas9 или CRISPR/Cpf1 для модулирования экспрессирования, по меньшей мере, одного белка.

[0336] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку систем коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR)/Cas9 или CRISPR/Cpf1 для ингибирования экспрессирования PD-1 и LAG-3.

2. Способы TALE

[0337] Способ размножения ТП в терапевтическую популяцию может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2А), или как описано в РСТ/US2017/058610, РСТ/US2018/012605 или РСТ/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТП с помощью способа TALE. Согласно конкретным вариантам осуществления, использование способа TALE в ходе способа размножения ТП вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей

мере, у части терапевтической популяции TIL. Альтернативно, использование способа TALE в ходе способа размножения TIL вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

[0338] TALE маркирует “эффекторные белки подобные активаторам транскрипции”, которые включают TALEN (“эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции”). Способ использования системы TALE для редактирования гена может также упоминаться в настоящем документе как способ TALE. TALE представляют собой встречающиеся в природе белки из рода патогенных бактерий растений *Xanthomonas* и содержат ДНК-связывающие домены, состоящие из ряда доменов повторений из 33-35 аминокислот, которые, каждый, распознают одну пару оснований. Специфичность TALE определяется двумя гипервариабельными аминокислотами, которые известны как пара вариабельных остатков аминокислот (RVD). Модулярные повторы TALE соединены вместе для распознавания непрерывных последовательностей ДНК. Конкретный RVD в ДНК-связывающем домене распознает основание в целевом локусе, давая структурную особенность для сборки предсказуемых ДНК-связывающих доменов. ДНК-связывающие домены TALE слиты с каталитическим доменом типа эндонуклеазы IIS FokI для получения нацеливаемой нуклеазы TALE. Для индуцирования сайт-специфичной мутации, две индивидуальных руки TALEN, разделенные спейсерной областью из 14-20 пар оснований, приводят мономеры FokI в близкое соседство для димеризации и получения целевого двухнитевого разрыва.

[0339] Несколько больших систематических исследований, использующих различные способы сборки, показали, что повторы TALE могут объединяться для распознавания, по существу, любой определенной пользователем последовательности. Стратегии, которые делают возможной быструю сборку оригинальных матриц TALE, включают молекулярное клонирование Golden Gate, высокопроизводительную сборку в твердой фазе и технологии клонирования независимые от лигирования. Оригинальные матрицы TALE также коммерчески доступны от Collectis BioResearch (Paris, France), Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, USA) и Life Technologies (Grand Island, NY, USA). В дополнение к этому доступны инструменты на основе Интернета, такие как TAL Effector-Nucleotide Target 2.0, которые делают возможным конструирование оригинальных матриц эффекторных повторов TAL для желаемых мишеней, а также дают предсказанные сайты связывания эффекторов TAL. *См. Doyle, et al., Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, W117-W122. Примеры способов TALE и TALEN пригодных для использования по настоящему изобретению описаны в публикациях заявок на патенты США №№ US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 и US 2016/0120906 A1, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0340] Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, способ TALE включает сайленсирование или редуцирование экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек посредством ингибирования или

предотвращения транскрипции целевого гена (генов). Например, способ TALE может включать использование KRAB-TALE, где способ включает слияние транскрипционного домена Крупнель-ассоциированного бокса (KRAB) с доменом связывания ДНК, который нацелен на сайт начала транскрипции гена, что приводит к ингибированию или предотвращению транскрипции гена.

[0341] Согласно другому варианту осуществления, способ TALE включает сайленсирование или редуцирование экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек посредством введения мутации в целевой ген (гены). Например, способ TALE может включать слияние эффекторного домена нуклеазы, такого как FokI, с доменом связывания ДНК TALE, с получением в результате TALEN. FokI является активным как димер; следовательно, способ включает конструирование пар TALEN для размещения доменов нуклеазы FOKL на соседних целевых сайтах генома, где они вводят двухнитевые разрывы ДНК. Двухнитевый разрыв может осуществляться после правильного позиционирования и димеризации FokI. После введения двухнитевого разрыва, репарация ДНК может осуществляться по двум различным механизмам: пары высокоточных гомологических рекомбинаций (HRR) (также известной как гомологически направленная репарация или HDR) или склонного к ошибкам нехомологичного соединения концов (NHEJ). Репарация двухнитевых разрывов с помощью NHEJ предпочтительно дает в результате делеции, инсерции или замещения целевого сайта ДНК, *то есть*, NHEJ, как правило, приводит к введению малых инсерций и делеций в место разрыва, часто вызывая индуцирование сдвигов рамки, которые нокаутируют функцию гена. Согласно конкретным вариантам осуществления, пары TALEN нацелены на большинство 5' экзонов генов, способствуя ранним мутациям сдвига рамок или появлению незрелых стоп-кодонов. Генетическая мутация (мутации), вводимая посредством TALEN, предпочтительно является постоянной. Таким образом, согласно одному из вариантов осуществления, способ включает сайленсирование или редуцирование экспрессирования гена иммунной контрольной точки посредством использования димеризованных TALEN для индуцирования сайт-специфичного двухнитевого разрыва, который репарируется с помощью склонного к ошибкам NHEJ, приводя к появлению одной или нескольких мутаций в целевом гене иммунной контрольной точки.

[0342] Согласно дополнительным вариантам осуществления, TALEN используют для введения генетических изменений с помощью HRR, таких как неслучайные точечные мутации, целевая делеция или добавление фрагментов ДНК. Введение двухнитевых разрывов ДНК делает возможным редактирование генома посредством гомологичной рекомбинации в присутствии соответствующей донорной ДНК. Согласно одному из вариантов осуществления, способ включает совместную доставку димеризованных TALEN и донорной плазмиды, несущей локус-специфичные гомологичные руки, для введения сайт-специфичного двухнитевого разрыва и встраивания одного или нескольких трансгенов в ДНК.

[0343] Согласно другому варианту осуществления, TALEN, который представляет

собой гибридный белок, полученный из FokI и AvrXa7, как описано в публикации патента США № 2011/0201118, можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения. Этот TALEN сохраняет специфичность распознавания целевых нуклеотидов AvrXa7 и активность расщепления двухнитевой ДНК FokI. Такие же способы можно использовать для получения других TALEN, имеющих другую специфичность распознавания. Например, компактные TALEN можно генерировать посредством генной инженерии каркаса сердцевины TALE, содержащего различные наборы RVD, для изменения специфичности связывания ДНК и нацеливания на конкретную целевую последовательность конкретной одинарной dsDNA. *Смотри*, публикацию патента США № 2013/0117869. Выбор каталитических доменов может объединяться с каркасом для осуществления процессирования ДНК, которая может подвергаться генной инженерии для обеспечения того, чтобы каталитический домен мог осуществлять процессирование ДНК вблизи целевой последовательности одинарной dsDNA, при слиянии с каркасом сердцевины TALE. Пептидный линкер может также подвергаться генной инженерии для слияния каталитического домена с каркасом для создания компактного TALEN, состоящего из одинарной полипептидной цепи, который не требует димеризации для нацеливания на конкретную последовательность одинарной dsDNA. Каркас сердцевины TALE может также модифицироваться посредством слияния каталитического домена, который может представлять собой мономер TAL, с его N-окончанием, делая возможным взаимодействие этого каталитического домена с другим каталитическим доменом, слитым с другим мономером TAL, создавая при этом каталитический объект, подобно процессированию ДНК вблизи от целевых последовательностей. *Смотри* публикацию патента США № 2015/0203871. Эта архитектура позволяет нацеливание только на одну нить ДНК, что не является возможным для классических архитектур TALEN.

[0344] Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, обычные RVD могут использоваться для получения TALEN, которые способны значительно уменьшить экспрессирование генов. В одном из вариантов осуществления, четыре RVD, NI, HD, NN и NG, используются для нацеливания аденина, цитозина, гуанина и тимина, соответственно. Эти обычные RVD можно использовать, например, для получения нацеливания TALEN на ген PD-1. Примеры TALEN, использующих обычные RVD, включают TALEN T3v1 и T1, описанные в Gautron *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* Dec. 2017, Vol. 9:312-321 (Gautron), которая включается в настоящий документ в качестве ссылки. TALEN T3v1 и T1 нацелены на второй экзон локуса PDCD1, где находится сайт связывания PD-L1, и они могут значительно уменьшить продуцирование PD-1. В одном из вариантов осуществления, TALEN T1 делает это, используя целевую SEQ ID NO:127, а TALEN T3v1, или делает это, используя целевую SEQ ID NO:128.

[0345] Согласно другому варианту осуществления, TALEN модифицируют, используя необычные RVD для улучшения их активности и специфичности к целевому гену, как описано в Gautron. Встречающиеся в природе RVD покрывают только малую долю потенциального репертуара разнообразия для положений гипервариабельных

аминокислот. Необычные RVD обеспечивают альтернативу природным RVD и имеют новые собственные особенности специфичности нацеливания, которые можно использовать для исключения нацеливания на мишени вне сайта (последовательности в геноме, которые содержат несколько несогласованностей относительно целевой последовательности) посредством TALEN. Необычные RVD могут идентифицироваться с помощью генерирования и скрининга коллекций TALEN, содержащих альтернативные сочетания аминокислот в двух положениях гипервариабельных аминокислот в определенных положениях матрицы, как описано в Juillerat, *et al.*, *Scientific Reports* 5, Article Number 8150 (2015), которая включается в настоящий документ в качестве ссылки. Затем, могут выбираться необычные RVD, которые чувствуют различия между нуклеотидами, присутствующими в положении несоответствий, которые могут предотвращать активность TALEN на последовательностях вне сайта, при этом по-прежнему делая возможным соответствующий процессирование целевого положения. Затем выбранные необычные RVD могут использоваться для замены обычных RVD в TALEN. Примеры TALEN, где обычные RVD заменены необычными RVD, включают TALEN T3v2 и T3v3 PD-1, производимые Gautron. Эти TALEN имеют повышенную специфичность, по сравнению с TALEN, использующими обычный RVD.

[0346] Согласно дополнительным вариантам осуществления, TALEN можно использовать для введения генетических изменений для сайленсирования или редуцирования экспрессирования двух генов. Например, можно генерировать два различных TALEN для нацеливания на два разных гена, а затем использовать их вместе. Молекулярные события, генерируемые двумя TALEN в их соответствующих локусах и потенциальных сайтах вне мишени, можно характеризовать с помощью высокопроизводительного секвенирования ДНК. Это делает возможным анализ сайтов вне мишени и идентификацию сайтов, которые могут быть получены в результате использования обоих TALEN. На основе этой информации, можно выбрать соответствующие обычные и необычные RVD для генной инженерии TALEN, которые имеют повышенную специфичность и активность, даже когда они используются вместе. Например, Gautron описывает совместное использование TALEN T3v4 PD-1 и TRAC для получения двойного нокаута Т-клеток CAR, которые поддерживают сильнодействующую противоопухолевую функцию *in vitro*.

[0347] В одном из вариантов осуществления, способ Gautron или другие способы, описанные в настоящем документе, могут использоваться для редактирования генома TIL, которые затем могут размножаться с помощью любой из процедур, описанных в настоящем документе. В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает стадии:

- (a) активирования первой популяции TIL полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;
- (b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции TIL, используя электропорообразование эффекторных нуклеаз подобных активаторам

транскрипции для получения второй популяции ТП;

(с) необязательно, инкубирования второй популяции ТП;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения третьей популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения третьей популяции ТП;

(е) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток третьей популяции ТП дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения четвертой популяции ТП, где четвертая популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(f) сбора терапевтической популяции ТП, полученной со стадии (е);

(g) переноса собранной популяции ТП на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0348] В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает стадии:

(a) активирования первой популяции ТП полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;

(b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции ТП, используя электропорообразование эффекторных нуклеаз подобных активаторам транскрипции в среде для цитопорообразования для получения второй популяции ТП;

(с) необязательно, инкубирования второй популяции ТП;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения третьей популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 6-9 дней для получения третьей популяции ТП;

(е) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток третьей популяции ТП дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 9-11 дней для получения четвертой популяции ТП, где четвертая популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(f) сбора терапевтической популяции ТП, полученной со стадии (е);

(g) переноса собранной популяции ТП на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0349] В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИ) в терапевтическую популяцию ТП включает стадии:

(a) активирования первой популяции ТП полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;

(b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции ТП, используя электропорообразование эффекторных нуклеаз подобных активаторам транскрипции в среде для цитопорообразования для получения второй популяции ТП;

(c) необязательно, инкубирования второй популяции ТП, где инкубирование осуществляется примерно при 30-40°C примерно с 5% CO₂;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно ОКТ-3, для получения третьей популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 6-9 дней для получения третьей популяции ТП;

(e) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток третьей популяции ТП дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 9-11 дней для получения четвертой популяции ТП, где четвертая популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(f) сбора терапевтической популяции ТП, полученной со стадии (e);

(g) переноса собранной популяции ТП на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0350] Согласно другому варианту осуществления, TALEN могут конструироваться специфично, что делает возможным повышение доли событий DSB в целевой клетке (клетках), которые могут нацеливать специфичную селекцию генов. Смотри, публикацию патента США № 2013/0315884. Использование таких редко режущих эндонуклеаз повышает шансы получения двойной дезактивации целевых генов в трансфицированных клетках, делая возможным получение генно-инженерных клеток, таких как Т-клетки. Кроме того, можно вводить дополнительные каталитические домены с помощью TALEN для усиления мутагенеза и усиления дезактивации целевого гена. TALEN, описанные в публикации патента США № 2013/0315884, успешно использовались для генной инженерии Т-клеток, чтобы сделать их пригодными для иммунотерапии. TALEN можно

также использовать для дезактивации различных генов иммунных контрольных точек в Т-клетках, включая дезактивацию, по меньшей мере, двух генов в одной Т-клетке. *Смотри*, публикацию патента США № 2016/0120906. В дополнение к этому, TALEN можно использовать для дезактивации генов, кодирующих мишени для иммуносупрессивных агентов и рецепторов Т-клеток, как описано в публикации патента США № 2018/0021379, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки. Кроме того, TALEN можно использовать для ингибирования экспрессирования бета 2-микроглобулина (B2M) и/или трансаактиватора главного комплекса гистосовместимости класса II (СИТА), как описано в публикации патента США № 2019/0010514, которая включается в качестве ссылки в настоящий документ.

[0351] Неограничивающие примеры генов, которые могут сайленсироваться или ингибироваться посредством постоянного редактирования генома TIL с помощью способа TALE, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

[0352] Неограничивающие примеры TALE-нуклеаз, нацеливающих ген PD-1, приводятся в следующей далее таблице. В этих примерах, целевые геномные последовательности содержат две последовательности длиной 17 пар оснований (bp) (упоминаются как половинные мишени, показанные прописными буквами), разделенные спейсером 15 bp (показаны строчными буквами). Каждая половинная мишень распознается повторами половинных нуклеаз TALE, приведенных в Таблице. Таким образом, согласно конкретным вариантам осуществления, TALE-нуклеазы по настоящему изобретению распознают и расщепляют целевую последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 127 и SEQ ID NO: 128. Последовательности TALEN и способы редактирования генома также описаны в Gautron, обсуждаемой выше.

№	Целевая последовательность PD-1	Последовательность повторов	Половинная нуклеаза TALE
1	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA (SEQ ID NO:127)	Повтор PD-1-левый (SEQ ID NO:129) Повтор PD-1-правый (SEQ ID NO: 130)	PD-1-левый TALEN (SEQ ID NO:133) PD-1-правый TALEN (SEQ ID NO:134)
2	TACCTCTGTGGGGCCAT ctccctggcccca GGCGCAGATCAAAGAGA (SEQ ID NO:128)	Повтор PD-1-левый (SEQ ID NO:131) Повтор PD-1-правый (SEQ ID NO: 132)	PD-1-левый TALEN (SEQ ID NO:135) PD-1-правый TALEN (SEQ ID NO:136)

[0353] В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает стадии:

(а) активирования первой популяции TIL полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;

(b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции ТП, используя электропорообразование эффекторных нуклеаз подобных активаторам транскрипции, нацеливающих PDCD1 в среде для цитопорообразования для получения второй популяции ТП;

(c) необязательно, инкубирования второй популяции ТП, где инкубирование осуществляется примерно при 30-40°C примерно с 5% CO₂;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения третьей популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 6-9 дней для получения третьей популяции ТП;

(e) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток третьей популяции ТП дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 9-11 дней для получения четвертой популяции ТП, где четвертая популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(f) сбора терапевтической популяции ТП, полученной со стадии (e);

(g) переноса собранной популяции ТП на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0354] В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает стадии:

(a) активирования первой популяции ТП полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;

(b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции ТП, используя электропорообразование эффекторных нуклеаз подобных активаторам транскрипции, нацеливающих SEQ ID NO:128 в среде для цитопорообразования для получения второй популяции ТП;

(c) необязательно, инкубирования второй популяции ТП, где инкубирование осуществляется при примерно 30-40°C с примерно 5% CO₂;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения третьей популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 6-9 дней для получения третьей популяции ТП;

(e) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для

культивирования клеток третьей популяции ТИЛ дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 9-11 дней для получения четвертой популяции ТИЛ, где четвертая популяция ТИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТИЛ;

(f) сбора терапевтической популяции ТИЛ, полученной со стадии (e);

(g) переноса собранной популяции ТИЛ на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0355] В одном из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ включает стадии:

(a) активирования первой популяции ТИЛ полученной из опухоли, резецированной у пациента, используя активирующих шариков или антител CD3 и CD28 в течение 1-5 дней;

(b) редактирования генома, по меньшей мере, части первой популяции ТИЛ, используя электропорообразование mRNA эффекторной нуклеазы подобной активаторам транскрипции согласно SEQ ID NO:135 и SEQ ID NO:136 в среде для цитопорообразования для получения второй популяции ТИЛ;

(c) необязательно, инкубирования второй популяции ТИЛ, где инкубирование осуществляется примерно при 30-40°C примерно 5% с CO₂;

(d) осуществления первого размножения посредством культивирования второй популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и необязательно, ОКТ-3, для получения третьей популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 6-9 дней для получения третьей популяции ТИЛ;

(e) осуществления второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток третьей популяции ТИЛ дополнительным ИЛ-2, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения четвертой популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 9-11 дней для получения четвертой популяции ТИЛ, где четвертая популяция ТИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТИЛ;

(f) сбора терапевтической популяции ТИЛ, полученной со стадии (e);

(g) переноса собранной популяции ТИЛ на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(h) где одна или несколько стадий (a) - (g) осуществляются в замкнутой стерильной системе.

[0356] Другие неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены с помощью постоянного редактирования генома ТИЛ с помощью способа TALE, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-15, ИЛ-21,

внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0357] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессирования последовательности целевого гена с помощью способа TALE, которые можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, описаны в патенте США № 8586526, который включается в настоящий документ в качестве ссылки. Эти описанные примеры включают использование не встречающегося в природе ДНК-связывающего полипептида, который содержит две или более единицы TALE-повторов, содержащих повтор RVD, N-кэпирующий полипептид, состоящий из остатков белка TALE, и С-кэпирующий полипептид, состоящий из фрагмента полноразмерной С-конечной области белка TALE.

[0358] Примеры дизайнов и стратегий дизайна TALEN, оценок активности, стратегий скрининга и способов, которые можно использовать для эффективного осуществления TALEN-медируемого встраивания и инактивации гена, и которые можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, описаны в Valton, *et al.*, *Methods*, 2014, 69, 151-170, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки.

[0359] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции TIL, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции TIL, где вторая популяция TIL, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция TIL, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции TIL, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции TIL в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции TIL дополнительным IL-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом OX40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции TIL, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции TIL, где второе

размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы нуклеаз TALE для модулирования экспрессирования, по меньшей мере, одного белка.

[0360] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИ) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы нуклеазы TALE для подавления экспрессирования PD-1 и LAG-3.

3. Цинк-пальцевые способы

[0361] Способ размножения ТП в терапевтическую популяцию может осуществляться согласно любому из вариантов осуществления способов, описанных в настоящем документе (например, процесса 2A), или как описано в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, где способ дополнительно включает редактирование генома, по меньшей мере, части ТП с помощью цинк-пальцевого способа или способа цинк-пальцевой нуклеазы. Согласно конкретным вариантам осуществления, использование цинк-пальцевого способа в ходе способа размножения ТП вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТП. Альтернативно, использование цинк-пальцевого способа в ходе способа размножения ТП вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТП.

[0362] Индивидуальный цинковый палец содержат приблизительно 30 аминокислот в консервативной конфигурации $\beta\beta\alpha$. Несколько аминокислот на поверхности α -спирали, обычно находятся в контакте с 3 bp в главной бороздке ДНК, при различных уровнях селективности. Цинковые пальцы имеют два белковых домена. Первый домен представляет собой домен связывания ДНК, который содержит эукариотические факторы транскрипции и содержит цинковые пальцы. Второй домен представляет собой домен нуклеазы, который содержит фермент рестрикции FokI и является ответственным за каталитическое расщепление ДНК.

[0363] ДНК-связывающие домены отдельных ZFN, как правило, содержат в пределах трех – шести повторов индивидуальных цинковых пальцев и могут, каждый, распознавать в пределах 9-18 пар оснований. Если цинк-пальцевые домены являются специфичными к их предполагаемому целевому сайту, тогда даже пара 3-пальцевых ZFN, которая распознает в целом 18 пар оснований, может, в теории, нацеливаться на отдельный локус в геноме млекопитающего. Один из способов генерирования новых цинк-пальцевых матриц заключается в объединении меньших цинк-пальцевых "модулей" с известной специфичностью. Наиболее распространенный процесс модульной сборки включает

объединение трех отдельных цинковых пальцев, который, каждый, могут распознавать последовательность ДНК из 3 пар оснований с генерированием 3-пальцевой матрицы, которая может распознавать целевой сайт с 9 парами оснований. Альтернативно, можно использовать подходы на основе селекции, такие как генная инженерия олигомеризованного пула (OPEN), для селекции новых цинк-пальцевых матриц из рандомизированных библиотек, которые усиливают контекстно-зависимые взаимодействия между соседними пальцами. Генно-инженерные цинковые пальцы являются доступными коммерчески; Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) разработали патентованную платформу (CompoZr®) для цинк-пальцевого конструирования в партнерстве с Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

[0364] Неограничивающие примеры генов, которые могут сайленсироваться или ингибироваться посредством постоянного редактирования генома TIL с помощью цинк-пальцевого способа, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3. [0365] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены с помощью постоянного редактирования генома TIL посредством цинк-пальцевого способа, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

[0366] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессирования последовательности целевого гена посредством цинк-пальцевого способа, который можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, описаны в патентах США №№ 6534261, 6607882, 6746838, 6794136, 6824978, 6866997, 6933113, 6979539, 7013219, 7030215, 7220719, 7241573, 7241574, 7585849, 7595376, 6903185 и 6479626, которые включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0367] Другие примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессирования последовательности целевого гена с помощью цинк-пальцевого способа, который можно использовать согласно вариантам осуществления настоящего изобретения, описаны в Beane, *et al.*, *Mol. Therapy*, 2015, 23 1380-1390, описание которой включается в настоящий документ в качестве ссылки.

[0368] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL включает:

- (a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;
- (b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;
- (c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой

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

(d) добавление ОКТ-3 для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы цинк-пальцевых нуклеаз для модулирования экспрессирования, по меньшей мере, одного белка.

[0369] Согласно одному из вариантов осуществления, способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТП включает:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

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

(d) добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое

размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным П-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы цинк-пальцевых нуклеаз для подавления экспрессирования PD-1 и LAG-3.

IV. Способы получения ТП

[0370] Иллюстративный способ ТП известный как процесс 2А, включающий некоторые из этих признаков, изображен на Фигуре 1, и некоторые преимущества этого варианта осуществления настоящего изобретения перед процессом 1С описаны на Фигуре 2, как это сделано на Фигуре 14. Процесс 1С показан для сравнения на Фигуре 3. Два альтернативных временных графика для терапии ТП на основе процесса 2А показаны на Фигуре 4 (более высокие отсчеты клеток) и на Фигуре 5 (более низкие отсчеты клеток). Вариант осуществления процесса 2А показан на Фигуре 6, а также на Фигуре 9. Фигуры 13 и 14 дополнительно предлагают иллюстративный процесс 2А по сравнению с иллюстративным процессом 1С.

[0371] Как обсуждается в настоящем документе, настоящее изобретение может включать стадию, относящуюся к повторному стимулированию криоконсервированных ТП для повышения их метаболической активности и таким образом их относительного

здоровья перед трансплантацией пациенту, и способы исследования указанного метаболического здоровья. Как в целом показано в настоящем документе, ТП, как правило, отбирают из образца от пациента и подвергают манипуляциям для увеличения их количества перед трансплантацией пациенту. В некоторых вариантах осуществления, ТП могут необязательно подвергаться генетическим манипуляциям, как обсуждается ниже.

[0372] В некоторых вариантах осуществления, ТП могут криоконсервироваться. После оттаивания, они также могут повторно стимулироваться для повышения их метаболизма перед вливанием пациенту.

[0373] В некоторых вариантах осуществления, первое размножение (включающее процессы, упоминаемые как пред-REP, а также процессы, показанные на Фигуре 9 как Стадия А) сокращается до 3-14 дней, а второе размножение (включающее процессы, упоминаемые как REP, а также процессы, показанные на Фигуре 9 как Стадия В) сокращается до 7-14 дней, как подробно обсуждается ниже, а также в Примерах и на Фигурах. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение (например, размножение, описанное как Стадия В на Фигуре 9) сокращается до 11 дней и второе размножение (например, размножение, как описано на Стадии D на Фигуре 9) сокращается до 11 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4, 5 и 27. В некоторых вариантах осуществления, сочетание первого размножения и второго размножения (например, размножений, описанных как Стадия В и Стадия D на Фигуре 9) сокращается до 22 дня, как обсуждается подробно ниже, как и в Примерах, так и на Фигурах.

[0374] Маркировки “Стадий” А, В, С, и тому подобное, ниже, относятся к Фигуре 9 и относятся к определенным вариантам осуществления, описанным в настоящем документе. Порядок осуществления Стадий ниже и на Фигуре 9 является иллюстративным и любое сочетание или порядок стадий, а также дополнительные стадии, повторение стадий и/или отсутствие стадий предполагается в настоящей заявке и в способах, описанных в настоящем документе.

А. СТАДИЯ А: Получение образца опухоли от пациента

[0375] Как правило, ТП сначала получают из образца опухоли пациента (“первичные ТП”), а затем их размножают в большую популяцию для дополнительных манипуляций, как описано в настоящем документе, необязательно криоконсервируют, повторно стимулируют, как показано в настоящем документе, и необязательно оценивают на фенотип и метаболические параметры как показатели здоровья ТП.

[0376] Образец опухоли пациента можно получить, используя способы известные в данной области, как правило, с помощью хирургической резекции, пункционной биопсии или других средств для получения образца, который содержит смесь клеток опухоли и ТП. Как правило, образец опухоли может происходить из любой твердой опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли может также представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, полученную из гематологического злокачественного образования. Твердая опухоль может принадлежать к любому типу рака, включая, но, не ограничиваясь этим, рак молочной железы,

поджелудочной железы, простаты, ободочной и прямой кишки, легких, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая, но, не ограничиваясь этим, карциному сквамозных клеток, карциному базальных клеток и меланому). В некоторых вариантах осуществления, пригодные для использования ТП получают из злокачественных опухолей меланомы, поскольку они, как сообщается, имеют особенно высокие уровни ТП.

[0377] Термин “твердая опухоль” относится к аномальной массе ткани, которая обычно не содержит кист или жидких областей. Твердые опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин “твердая раковая опухоль” относится к злокачественным, неопластическим или твердым раковым опухолям. Твердые раковые опухоли включают, но, не ограничиваясь этим, саркому, карциному и лимфому, например, рак легких, молочной железы, трижды негативный рак молочной железы, рак простаты, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления, рак выбирается из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, карциному сквамозных клеток головы и шеи (HNSCC)), глиобластоме, раке яичников, саркому, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, трижды негативный рак молочной железы и немелкоклеточную карциному легких. Структура тканей твердых опухолей включает взаимозависимые отделения тканей, включающие паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых диспергированы раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающую окружающую микросреду.

[0378] Термин “гематологическое злокачественное новообразование” относится к раковым заболеваниям и опухолям гематопоетических и лимфоидных тканей млекопитающих, включая, но, не ограничиваясь этим, ткани крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные новообразования также упоминаются как “жидкие опухоли.” Гематологические злокачественные новообразования включают, но, не ограничиваясь этим, острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), хроническую лимфоцитарную лимфому (CLL), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (SLL), острый миелобластный лейкоз (AML), хронический миелолейкоз (CML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), лимфому Ходжкина и лимфому не-Ходжкина. Термин “гематологическое злокачественное новообразование В-клеток” относится к гематологическим злокачественным новообразованиям, которые воздействуют на В-клетки.

[0379] После получения, образец опухоли, как правило, фрагментируется используя острое рассечение на малые куски в пределах между 1 - примерно 8 мм³, при этом размер примерно 2-3 мм³ является особенно полезным. ТП культивируют из этих фрагментов, используя ферментативные гидролизаты опухоли. Такие гидролизаты опухоли можно получить посредством инкубирования в ферментативных средах (*например*, буфер 1640 Roswell Park Memorial Institute (RPMI), 2 mM глутамата, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (*например*, используя диссоциатор ткани). Гидролизаты опухоли можно получать посредством помещения опухоли в ферментативные среды и механического

диссоциирования опухоли в течение приблизительно 1 минуты, с последующим инкубированием в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, с последующими повторяющимися циклами механической диссоциации и инкубирования при упомянутых выше условиях, пока не останутся только маленькие кусочки ткани. В конце этого процесса, если суспензия клеток содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, можно осуществить разделение в градиенте плотности, используя разветвленный гидрофильный полисахарид FICOLL, для удаления этих клеток. Можно использовать альтернативные способы, известные в данной области, такие как те, которые описываются в публикации заявки на патент США № 2012/0244133 A1, описание которой включается в настоящий документ в качестве ссылки. Любые упомянутые выше способы можно использовать в любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, для способов размножения ТП или способов лечения рака.

[0380] Как правило, суспензия собранных клеток называется “популяция первичных клеток” или популяция “свежесобранных” клеток.

[0381] В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование включает физическое фрагментирование, включая, например, рассечение, а также гидролизацию. В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование представляет собой физическое фрагментирование. В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование представляет собой рассечение. В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование представляет собой гидролизацию. В некоторых вариантах осуществления, ТП могут сначала культивироваться вместе с ферментативными гидролизатами опухоли и фрагментами опухолей, полученными от пациентов. В одном из вариантов осуществления, ТП могут сначала культивироваться вместе с ферментативными гидролизатами опухоли и фрагментами опухолей, полученными от пациентов.

[0382] В некоторых вариантах осуществления, когда опухоль представляет собой твердую опухоль, опухоль подвергается физическому фрагментированию после получения образца опухоли, например, на Стадии А (как показано на Фигуре 9). В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование осуществляется до криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование осуществляется после криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, фрагментирование осуществляется после получения опухоли и в отсутствие 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 содержат примерно 4 - примерно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм³. В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно от 30 примерно до

60 фрагментов с общим объемом примерно от 1300 мм³ примерно до 1500 мм³. В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм³. В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общей массой примерно от 1 грамма примерно до 1,5 грамма. В некоторых вариантах осуществления, множество фрагментов содержит примерно 4 фрагмента.

[0383] В некоторых вариантах осуществления, ТП получают из фрагментов опухоли. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли получают посредством острого рассечения. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли имеет объем примерно 1 мм³-10 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли имеет объем примерно 1 мм³-8 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 1 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 2 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 3 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 4 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 5 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 6 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 7 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 8 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 9 мм³. В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно 10 мм³.

[0384] В некоторых вариантах осуществления, ТП получают из гидролизатов опухоли. В некоторых вариантах осуществления, гидролизаты опухоли генерируют посредством инкубирования в ферментативных средах, например, но, не ограничиваясь этим, в RPMI 1640, 2 mM GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 Ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA). После помещения опухоли в ферментативные среды, опухоль может механически диссоциироваться в течение приблизительно 1 минуты. Затем раствор может инкубироваться в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, а затем он снова механически разрушается в течение приблизительно 1 минуты. После повторного инкубирования в течение 30 минут при 37°C в 5% CO₂, опухоль может механически разрушаться в третий раз в течение приблизительно 1 минуты. В некоторых вариантах осуществления, после третьего механического разрушения, если присутствуют большие куски ткани, к образцу применяют 1 или 2 дополнительных механических диссоциаций, с инкубированием в течение при 30 дополнительных минут при 37°C в 5% CO₂ или без него. В некоторых вариантах осуществления, в конце конечного инкубирования, если суспензия клеток содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, осуществляется разделение в градиенте плотности, используя Ficoll, для удаления этих клеток.

[0385] В некоторых вариантах осуществления, суспензия собранных клеток перед первой стадией размножения называется “популяция первичных клеток” или популяция

“свежесобранных” клеток.

[0386] В некоторых вариантах осуществления, клетки можно необязательно замораживать после сбора образца и хранить замороженными до поступления на размножение, описанное на Стадии В, которое описывается более подробно ниже, а также иллюстрируется на Фигуре 9.

В. СТАДИЯ В: Первое размножение

1. Молодые ТП

[0387] В некоторых вариантах осуществления, настоящие способы предлагают получение молодых ТП, которые способны к увеличению циклов репликации при введении субъекту/пациенту, и как таковые могут обеспечить дополнительные терапевтические преимущества по сравнению с более старыми ТП (*то есть*, с ТП, которые дополнительно подвергаются нескольким раундам репликации перед введением субъекту/пациенту). Особенности молодых ТП описаны в литературе, например, в Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157–167 (2012); Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122–6131 (2010); Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258–267 (2005); Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1–OF9 (2013); Besser et al., *J Immunother* 32:415–423 (2009); Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125–7130; Shen et al., *J Immunother*, 30:123–129 (2007); Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53–62 (2005); и Tran, et al., *J Immunother*, 31:742–751 (2008), все они включаются в настоящий документ в качестве ссылок во всей своей полноте.

[0388] Разнообразные рецепторы антигенов Т и В лимфоцитов продуцируются посредством соматической рекомбинации ограниченного, но большого количества сегментов гена. Эти сегменты гена: V (вариабельные), D (D-сегмент), J (соединительный) и C (константный), определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и рецепторов Т-клеток (TCR). Настоящее изобретение предлагает способ генерирования ТП, который демонстрирует повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные с помощью настоящего способа, демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные с помощью настоящего способа демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные с помощью настоящего способа, демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными ТП и/или ТП, полученными, используя способы, упоминаемые как процесс 1С, как иллюстрируется на Фигуре 13. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные при первом размножении, демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, повышение разнообразия представляет собой повышение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия рецепторов Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие иммуноглобулинов относится к тяжелой цепи иммуноглобулина. В

некоторых вариантах осуществления, разнообразие иммуноглобулинов относится к легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие относится к рецептору Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие относится к одному из рецепторов Т-клеток, выбранному из группы, состоящей из альфа-, бета-, гамма- и дельта-рецепторов. В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования альфа-рецепторов и/или бета-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования альфа-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования бета-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования TCRab (*то есть*, TCR α/β).

[0389] После рассечения или гидролиза фрагментов опухоли, например, как описано на Стадии А Фигуры 9, полученные в результате клетки культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, при условиях, которые способствуют росту ТИЛ по сравнению с клетками опухоли и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления, гидролизаты опухоли инкубируют в 2-мл лунках в средах, содержащих дезактивированную сыворотку АВ человека с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода в несколько дней, как правило, 3-14 дней, получая в результате объемную популяцию ТИЛ, как правило, примерно 1×10^8 объемных клеток ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления, эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода 7-14 дней, получая в результате объемную популяцию ТИЛ, как правило, примерно 1×10^8 объемных клеток ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления, эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода 10-14 дней, получая в результате объемную популяцию ТИЛ, как правило, примерно 1×10^8 объемных клеток ТИЛ. В некоторых вариантах осуществления, эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода примерно 11 дней, получая в результате объемную популяцию ТИЛ, как правило, примерно 1×10^8 объемных клеток ТИЛ.

[0390] В предпочтительном варианте осуществления, размножение ТИЛ может осуществляться используя стадии начального объемного размножения ТИЛ (например, такую, как описано на Стадии В Фигуры 9, что может включать процессы, упоминаемые как пред-REP), как описано ниже и в настоящем документе, с последующим вторым размножением (Стадия D, включающая процессы упоминаемые как стадии протокола быстрого размножения (REP)), как описано ниже как Стадия D, и в настоящем документе, с последующим необязательным криоконсервированием, и с последующей второй Стадией D (включающей процессы, упоминаемые как стадии REP с повторным стимулированием), как описано ниже и в настоящем документе. ТИЛ, полученные от этого способа, могут необязательно характеризоваться характеристиками фенотипа и метаболическими параметрами, как описано в настоящем документе.

[0391] В вариантах осуществления, где культуры ТИЛ иницируются в 24-луночных планшетах, например, используя 24-луночный кластер для культивирования клеток Costar с плоским дном (Corning Incorporated, Corning, NY, каждая лунка может засеиваться 1×10^6

гидролизированных клеток опухоли или одним фрагментом опухоли в 2 мл полной среды (СМ) с IL-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Emeryville, CA). В некоторых вариантах осуществления, фрагмент опухоли составляет примерно от 1 мм³ до 10 мм³.

[0392] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования для первого размножения упоминается как "СМ", это сокращенное название сред для культивирования. В некоторых вариантах осуществления, СМ для Стадии В состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, дополненной 10% сывороткой АВ человека, 25 мМ Нерес и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, где культуры иницируются в газопроницаемых колбах с емкостью 40 мл и 10-см² газопроницаемым кремниевым дном (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Фиг.1), в каждую колбу загружают 10-40×10⁶ жизнеспособных гидролизированных клеток опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл СМ с IL-2. Как G-Rex10, так и 24-луночные планшеты инкубируют в увлажняемом инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ и через 5 дней после иницирования культуры, половину сред удаляют и заменяют свежей СМ и IL-2, и после дня 5, половину сред заменяют каждые 2-3 дня.

[0393] После приготовления фрагментов опухоли, полученные в результате клетки (*то есть*, фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей IL-2, при условиях, которые способствуют росту ТП по сравнению опухолевыми и другими клетками. В некоторых вариантах осуществления, гидролизаты опухоли инкубируют в 2-мл лунках в средах, содержащих дезактивированную сыворотку АВ человека (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии популяции клеток аАРС) с 6000 МЕ/мл IL-2. Эту популяцию первичных клеток культивируют в течение периода в несколько дней, как правило, 10-14 дней, давая в результате объемную популяцию ТП, как правило, примерно 1×10⁸ объемных клеток ТП. В некоторых вариантах осуществления, среда роста в ходе первого размножения содержит IL-2 или его вариант. В некоторых вариантах осуществления, IL представляет собой рекомбинантный IL-2 человека (rhIL-2). В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 20-30×10⁶ МЕ/мг для 1-мг флакона. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 20×10⁶ МЕ/мг для 1-мг флакона. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 25×10⁶ МЕ/мг для 1-мг флакона. В некоторых вариантах осуществления исходный раствор IL-2 имеет удельную активность 30×10⁶ МЕ/мг для 1-мг флакона. В некоторых вариантах осуществления, исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 4-8×10⁶ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления, исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 5-7×10⁶ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления, исходный раствор IL-2 имеет конечную концентрацию 6×10⁶ МЕ/мг IL-2. В некоторых вариантах осуществления, исходный раствор IL-2 приготавливают, как описано в Примере 4. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда 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

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, культурная среда для первого размножения содержит примерно 20 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда для первого размножения содержит примерно 15 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда для первого размножения содержит примерно 12 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда для первого размножения содержит примерно 10 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда для первого размножения содержит примерно 5 МЕ/мл IL-21 - примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, культурная среда 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.

[0396] В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ-3. Антитело ОКТ-3 может присутствовать в среде для культивирования клеток, начиная со дня 0 REP (*то есть*, в день начала REP) и/или дня 0 второго размножения (*то есть*, в день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл, и примерно 1 мкг/мл антитела ОКТ-3. В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит в пределах между 0,1 нг/мл и 1 нг/мл, между 1 нг/мл и 5 нг/мл, между 5 нг/мл и 10 нг/мл, между 10 нг/мл и 20 нг/мл, между 20 нг/мл и 30 нг/мл, между 30 нг/мл и 40 нг/мл, между 40 нг/мл и 50 нг/мл, и между 50 нг/мл и 100 нг/мл антитела ОКТ-3. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток не содержит антитела ОКТ-3.

[0397] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования для первого размножения упоминается как “СМ”, это сокращенное наименование для среды для культивирования. В некоторых вариантах осуществления, она упоминается как СМ1 (среда для культивирования 1). В некоторых вариантах осуществления, СМ состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, дополненной 10% сывороткой АВ человека, 25 мМ HEPES и 10 мг/мл гентамицина. В вариантах осуществления, где культуры иницируются в

газопроницаемых колбах емкостью 40 мл и с 10-см² газопроницаемым кремниевым дном (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN) (Фиг.1), каждую колбу загружают с 10-40×10⁶ жизнеспособных гидролизированных клеток опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл СМ с IL-2. Как G-Rex10, так и 24-луночные планшеты инкубируют в увлажняемом инкубаторе при 37°C в 5% CO₂ и через 5 дней после инициирования культивирования, половину среды удаляют и заменяют свежим СМ и 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 осуществляется в начальной среде для культивирования клеток или в первой среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, начальная среда для культивирования клеток или первая среда для культивирования клеток содержит IL-2.

[0398] В некоторых вариантах осуществления, процесс первого размножения (включая такие процессы, например, как описано на Стадии В Фигуры 9, которые могут включать процессы, иногда упоминаемые как пред-REP) сокращается до 3-14 дней, как обсуждается в Примерах и на Фигурах. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение (включая процессы, например, такие как описано на Стадии В Фигуры 9, которые могут включать процессы, иногда упоминаемые как пред-REP) сокращается до 7-14 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4 и 5, а также включают, например, размножение, как описано на Стадии В Фигуры 9. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение на Стадии В сокращается до 10-14 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение сокращается до 11 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4 и 5, а также включает, например, размножение, как описано на Стадии В Фигуры 9.

[0399] В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться 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 ТПЛ может осуществляться в течение 1 дня - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 2 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 3 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 4 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 5 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 6 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 7 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 8 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ может осуществляться в течение 9 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТПЛ

может осуществляться в течение 10 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 11 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 12 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 13 дней - 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 1 день - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 2 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 3 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 4 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 5 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 6 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 7 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 8 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 9 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 10 дней - 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение ТП может осуществляться в течение 11 дней.

[0400] В некоторых вариантах осуществления, сочетание ПЛ-2, ПЛ-7, ПЛ-15 и/или ПЛ-21 используют как сочетание в ходе первого размножения. В некоторых вариантах осуществления, ПЛ-2, ПЛ-7, ПЛ-15 и/или ПЛ-21, а также любые сочетания могут включаться в ходе первого размножения, например, в ходе Стадии В процессов согласно Фигуре 9, а также как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, сочетание ПЛ-2, ПЛ-15, и ПЛ-21 используется как сочетание в ходе первого размножения. В некоторых вариантах осуществления, ПЛ-2, ПЛ-15 и ПЛ-21, а также любые их сочетания могут включаться в ходе процесса на стадии В согласно Фигуре 9 и как описано в настоящем документе.

[0401] В некоторых вариантах осуществления, процесс первого размножения (включая процессы, упоминаемые как пред-REP; например, Стадия В согласно Фигуре 9) сокращается до 3-14 дней, как обсуждается в Примерах и на Фигурах. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение на Стадия В сокращается до 7-14 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4 и 5. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение на Стадия В сокращается до 10-14 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4, 5, и 9. В некоторых вариантах осуществления, первое размножение сокращается до 11 дней, как обсуждается в Примерах и показано на Фигурах 4, 5, и 9.

[0402] В некоторых вариантах осуществления, первое размножение, например, Стадия В согласно Фигуре 9, осуществляется в биореакторе замкнутой системы. В

некоторых вариантах осуществления, замкнутая система используется для размножения ТП, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления, один используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления, биореактор замкнутой системы представляет собой один биореактор.

[0403] В некоторых вариантах осуществления, первое размножение осуществляется с использованием дополнительного антитела-агониста 4-1BB, добавляемого в среду для культивирования клеток в начале размножения, используя любое из антител-агонистов 4-1BB, описанных далее в настоящем документе.

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

[0404] В некоторых случаях, объемная популяция ТП, полученная от первого размножения, включая, например, популяцию ТП, полученную, например, на Стадии В, как показано на Фигуре 9, может криоконсервироваться немедленно, используя протоколы, обсуждаемые ниже в настоящем документе. Альтернативно, популяция ТП, полученная от первого размножения, упоминаемая как вторая популяция ТП, может подвергаться второму размножению (которое может включать размножение, иногда упоминаемое как REP), а затем криоконсервироваться, как обсуждается ниже. Подобным же образом, в случае, когда генетически модифицированные ТП будут использоваться при терапии, первая популяция ТП (иногда упоминаемая как объемная популяция ТП) или вторая популяция ТП (которая может в некоторых вариантах осуществления включать популяции, упоминаемые как популяции REP ТП) может подвергаться генетическим модификациям в ходе соответствующих процессирований до размножения или после первого размножения и до второго размножения.

[0405] В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные от первого размножения (например, от Стадии В как показано на Фигуре 9), хранятся до их фенотипирования для селекции. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные от первого размножения (например, от Стадии В как показано Фигуры 9), не хранятся, а переходят непосредственно на второе размножение. В некоторых вариантах осуществления, ТП, полученные от первого размножения, не подвергаются криоконсервированию после первого размножения и до второго размножения. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 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 осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 3 дня - 14 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 4 дня - 14 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 4 дня - 10 дней после

осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 7 дней - 14 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит примерно через 14 дней после осуществления фрагментирования.

[illegible]

первого размножения на второе размножение происходит через 3 дня - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 4 дня - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 5 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 6 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 7 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 8 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 9 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 10 дней - 11 дней после осуществления фрагментирования. В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение происходит через 11 дней после осуществления фрагментирования.

[0407] В некоторых вариантах осуществления, ТП не хранятся после первого размножения и до второго размножения, и ТП переходят непосредственно на второе размножение (например, в некоторых вариантах осуществления, нет хранения в ходе перехода от Стадии В до Стадии D, как показано на Фигуре 9). В некоторых вариантах осуществления, переход осуществляется в замкнутой системе, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, ТП от первого размножения, вторая популяция ТП, переходит непосредственно ко второму размножению без переходного периода.

[0408] В некоторых вариантах осуществления, переход от первого размножения на второе размножение, например, на Стадию С на Фигуре 9, осуществляется в биореакторе замкнутой системы. В некоторых вариантах осуществления, используется замкнутая система для размножения ТП, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления, единственный используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления, биореактор замкнутой системы представляет собой один биореактор.

D. СТАДИЯ D: Второе размножение

[0409] В некоторых вариантах осуществления, популяция клеток ТП увеличивается в количестве после сбора и начального объемного процессирования, например, после Стадии А и Стадии В, и переход упоминается как Стадия С, как показано на Фигуре 9). Это дополнительное размножение упоминается в настоящем документе как второе размножение, которое может включать процессы размножения, упоминаемые в целом в

данной области как процесс быстрого размножения (REP; а также процессы, как показано на Стадии D Фигуры 9). Второе размножение, как правило, осуществляется с использованием сред для культивирования, содержащих ряд компонентов, включая клетки-фидеры, источник цитокинов и антитело анти-CD3, в газопроницаемом контейнере.

[0410] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение или второе размножение TIL (которое может включать размножение, иногда упоминаемое как REP; а также процессы, как показано на Стадии D Фигуры 9) может осуществляться, используя любые колбы или контейнеры для TIL, известные специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться 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 TIL может осуществляться в течение примерно 7 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 8 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 9 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 10 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 11 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 12 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 13 дней - примерно 14 дней. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение TIL может осуществляться в течение примерно 14 дней.

[0411] В одном из вариантов осуществления, второе размножение может осуществляться в газопроницаемом контейнере, используя способы по настоящему описанию (включая, например, размножение, упоминаемое как REP; а также процессы, как показано на Стадии D Фигуры 9). Например, TIL могут быстро размножаться, используя неспецифичное стимулирование рецепторов Т-клеток в присутствии интерлейкина-2 (IL-2) или интерлейкина-15 (IL-15). Неспецифичный стимул для рецепторов Т-клеток может включать, например, антитело анти-CD3, например, примерно 30 нг/мл ОКТ3, моноклональное антитело анти-CD3 мыши (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA) или UHCT-1 (коммерчески доступное от BioLegend, San Diego, CA, USA). TIL могут размножаться с индуцированием дополнительного стимулирования TIL *in vitro* посредством сайленсирования одного или нескольких антигенов в ходе второго размножения, включая их антигенные части, такие как эпитоп (эпитопы) рака, которые могут необязательно экспрессироваться из вектора, такого как пептид связывания антигена A2 лейкоцита человека (HLA-A2), например, 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27L) или gpl 00:209-217 (210M), необязательно, в присутствии фактора роста Т-клеток, такого как 300 МЕ/мл IL-2 или IL-15. Другие пригодные для использования антигены могут включать, например, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, антиген тирозиназы рака,

MAGE-A3, SSX-2 и VEGFR2 или их антигенные части. TIL могут также быстро размножаться посредством повторного стимулирования таким же антигеном (антигенами) рака, импульсно вводимыми на HLA-A2-экспрессирующие антиген-презентирующие клетки. Альтернативно, TIL могут дополнительно повторно стимулироваться, *например*, облученными, аутологичными лимфоцитами или облученными аллогенными лимфоцитами HLA-A2+ и IL-2. В некоторых вариантах осуществления, повторное стимулирование осуществляется как часть второго размножения. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется в присутствии облученных, аутологичных лимфоцитов или облученных аллогенных лимфоцитов HLA-A2+ и IL-2.

[0412] 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 в пределах между 1000 и 2000 МЕ/мл, между 2000 и 3000 МЕ/мл, между 3000 и 4000 МЕ/мл, между 4000 и 5000 МЕ/мл, между 5000 и 6000 МЕ/мл, между 6000 и 7000 МЕ/мл, между 7000 и 8000 МЕ/мл или между 8000 МЕ/мл IL-2.

[0413] В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит антитело ОКТ3. Антитело ОКТ-3 может присутствовать в среде для культивирования клеток, начиная с дня 0 REP (*то есть*, дня начала REP) и/или дня 0 второго размножения (*то есть*, дня начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток содержит примерно 30 нг/мл антитела ОКТ3. В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит примерно 0,1 нг/мл, примерно 0,5 нг/мл, примерно 1 нг/мл, примерно 2,5 нг/мл, примерно 5 нг/мл, примерно 7,5 нг/мл, примерно 10 нг/мл, примерно 15 нг/мл, примерно 20 нг/мл, примерно 25 нг/мл, примерно 30 нг/мл, примерно 35 нг/мл, примерно 40 нг/мл, примерно 50 нг/мл, примерно 60 нг/мл, примерно 70 нг/мл, примерно 80 нг/мл, примерно 90 нг/мл, примерно 100 нг/мл, примерно 200 нг/мл, примерно 500 нг/мл, и примерно 1 мкг/мл ОКТ3 антитела. В одном из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток содержит в пределах между 0,1 нг/мл и 1 нг/мл, между 1 нг/мл и 5 нг/мл, между 5 нг/мл и 10 нг/мл, между 10 нг/мл и 20 нг/мл, между 20 нг/мл и 30 нг/мл, между 30 нг/мл и 40 нг/мл, между 40 нг/мл и 50 нг/мл, и между 50 нг/мл и 100 нг/мл антитела ОКТ3. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования клеток не содержит антитела ОКТ-3.

[0414] В некоторых вариантах осуществления, сочетание IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21 используются как сочетание в ходе второго размножения. В некоторых вариантах

осуществления, IL-2, IL-7, IL-15 и/или IL-21, а также любые их сочетания могут включаться в ходе второго размножения, включая, например, в ходе процесса на стадиях D согласно Фигуре 9, а также, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, сочетание IL-2, IL-15 и IL-21 используются как сочетание в ходе второго размножения. В некоторых вариантах осуществления, IL-2, IL-15 и IL-21, а также любые их сочетания могут включаться в ходе процесса на стадиях D согласно Фигуре 9 и как описано в настоящем документе.

[0415] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение может осуществляться в дополненной среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие клетки-фидеры. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется в дополненной среде для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, дополненная среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие клетки-фидеры. В некоторых вариантах осуществления, вторая среда для культивирования клеток содержит IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие клетки (APC; также упоминается как антиген-презентирующие клетки-фидеры). В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие клетки-фидеры (*то есть*, антиген-презентирующие клетки).

[0416] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, 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, для второго размножения, содержит примерно 500 МЕ/мл IL-15 - примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 400 МЕ/мл IL-15 - примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 300 МЕ/мл IL-15 - примерно 100 МЕ/мл IL-15. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, 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.

[0417] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, 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, для второго размножения, содержит примерно 20 МЕ/мл IL-21 -

примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 15 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 12 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 10 МЕ/мл IL-21 - примерно 0,5 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения, содержит примерно 5 МЕ/мл IL-21 - примерно 1 МЕ/мл IL-21. В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, 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.

[0418] В некоторых вариантах осуществления антиген-презентирующие клетки-фидеры (APC) представляют собой РВМС. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к РВМС и/или антиген-презентирующим клеткам при быстром размножении и/или при втором размножении составляет примерно 1-25, примерно 1-50, примерно 1-100, примерно 1-125, примерно 1-150, примерно 1-175, примерно 1-200, примерно 1-225, примерно 1-250, примерно 1-275, примерно 1-300, примерно 1-325, примерно 1-350, примерно 1-375, примерно 1-400 или примерно 1-500. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к РВМС при быстром размножении и/или втором размножении находится в пределах между 1-50 и 1-300. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к РВМС при быстром размножении и/или втором размножении находится в пределах между 1-100 и 1-200.

[0419] В одном из вариантов осуществления, РЕР и/или второе размножение осуществляется в колбах, при этом объемные ТП смешиваются с 100- или 200-кратным избытком дезактивированных клеток-фидеров, 30 мг/мл антитела анти-CD3 ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2 в 150 мл среды. Замену среды осуществляют (как правило, замену 2/3 среды посредством респирации свежей средой) до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную камеру роста. Альтернативные камеры роста включают колбы G-Rex и газопроницаемые контейнеры, как обсуждается более подробно ниже.

[0420] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение (которое может включать процессы, упоминаемые как процесс РЕР) сокращается до 7-14 дней, как обсуждается в Примерах и на Фигурах. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение сокращается до 11 дней.

[0421] В одном из вариантов осуществления, РЕР и/или второе размножение может осуществляться, используя колбы Т-175 и газопроницаемые мешки, как описано ранее (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* 2008, 31, 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* 2003, 26, 332-42)

или газопроницаемую посуду для культивирования (колбы G-Rex). В некоторых вариантах осуществления, второе размножение (включая размножение упоминаемое как быстрое размножение) осуществляется в колбах T-175, и примерно 1×10^6 TIL суспендированных в 150 мл среды можно добавлять в каждую колбу T-175. TIL могут культивироваться в смеси 1:1 CM и среды AIM-V, дополненной 3000 ME/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Колбы T-175 могут инкубироваться при 37° С в 5% CO₂. Половину сред можно заменять в День 5, используя среду 50/50 с 3000 ME/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления, в День 7 клетки из двух колб T-175 могут объединяться в 3-л мешке и 300 мл AIM V с 5% сыворотки АВ человека и 3000 ME/мл IL-2 добавляют в 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом мешке считают каждый день или два, и свежую среду добавляют для поддержания отсчетов клеток в пределах между 0,5 и $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[0422] В одном из вариантов осуществления, второе размножение (которое может включать размножение, упоминаемое как REP, а также упоминаемое на Стадии D Фигуры 9) может осуществляться в газопроницаемых колбах емкостью 500 мл с 100-см² газопроницаемым кремниевым дном (G-Rex 100, коммерчески доступные от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA), 5×10^6 или 10×10^6 TIL могут культивироваться вместе с PBMC в 400 мл среды 50/50, дополненной 5% сывороткой АВ человека, 3000 ME/мл IL-2 и 30 нг/мл анти-CD3 (ОКТ3). Колбы G-Rex 100 могут инкубироваться при 37°С в 5% CO₂. В день 5, 250 мл супернатанта можно удалить и поместить в центрифужные бутылки и их центрифугируют при 1500 об/мин ($491 \times g$) в течение 10 минут. Осадки TIL могут повторно суспендироваться с помощью 150 мл свежей среды с 5% сыворотки АВ человека, 3000 ME/мл IL-2 и добавляться обратно в исходные колбы G-Rex 100. Когда TIL размножаются последовательно в колбах G-Rex 100, в День 7, TIL в каждой G-Rex 100 могут суспендироваться в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и суспензию клеток можно разделить на 3 аликвоты по 100 мл, которые можно использовать для засева 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу можно добавить 150 мл AIM-V с 5% сыворотки АВ человека и 3000 ME/мл IL-2. Колбы G-Rex 100 можно инкубировать при 37° С в 5% CO₂ и через 4 дня 150 мл AIM-V с 3000 ME/ мл IL-2 можно добавить в каждую колбу G-REX 100. Клетки можно собрать в День 14 культивирования.

[0423] В одном из вариантов осуществления, второе размножение (включая размножение, упоминаемое как REP) осуществляется в колбах, при этом объемные TIL смешиваются с 100- или 200-кратным избытком дезактивированных клеток-фидеров, 30 мг/мл антитела анти-CD3 ОКТ3 и 3000 ME/мл IL-2 в 150 мл среды. В некоторых вариантах осуществления, замену сред осуществляют до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную камеру роста. В некоторых вариантах осуществления, 2/3 среды заменяется посредством респирации свежей средой. В некоторых вариантах осуществления, альтернативные камеры роста включают колбы G-Rex и газопроницаемые контейнеры, как обсуждается более подробно ниже.

[0424] В одном из вариантов осуществления, осуществляется второе размножение (включая размножение, упоминаемое как REP), и оно дополнительно включает стадию, где

ТІЛ выбирают по превосходящей активности по отношению к опухоли. Можно использовать любой способ селекции, известный в данной области. Например, способы, описанные в публикации заявки на патент США № 2016/0010058 А1, описание которой включается в настоящий документ в качестве ссылки, можно использовать для селекции ТІЛ по превосходящей активности по отношению к опухоли.

[0425] Необязательно, анализ жизнеспособности клеток можно осуществлять после второго размножения (включая размножение, упоминаемое как размножение REP), используя стандартные анализы, известные в данной области. Например, можно осуществлять анализ с вытеснением трипанового синего на образце объемных ТІЛ, который селективно метит мертвые клетки и дает возможность для оценки жизнеспособности. В некоторых вариантах осуществления, можно считать образцы ТІЛ и определять жизнеспособность используя автоматический прибор для счета клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA). В некоторых вариантах осуществления, жизнеспособность определяют согласно протоколу Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter, описанному, например, в Примере 15.

[0426] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение (включая размножение, упоминаемое как REP) ТІЛ может осуществляться, используя колбы Т-175 и газопроницаемые мешки, как описано ранее (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, *J Immunother.*, 31:742–751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, *J Immunother.*, 26:332–342) или газопроницаемые колбы G-Rex. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется с использованием колб. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется с использованием газопроницаемых колб G-Rex. В некоторых вариантах осуществления, второе размножение осуществляется в колбах Т-175, и примерно 1×10^6 ТІЛ суспендируют примерно в 150 мл среды и добавляют их в каждую колбу Т-175. ТІЛ культивируют вместе с облученными (50 Gy) аллогенными РВМС в качестве клеток “фидеров” при отношении 1:100, и клетки культивируют в смеси 1:1 СМ и среды AIM-V (среды 50/50), дополненной 3000 МЕ/мл ІІ-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Колбы Т-175 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления, половину среды заменяют в День 5, используя среду 50/50 с 3000 МЕ/мл ІІ-2. В некоторых вариантах осуществления, в День 7, клетки из 2 колб Т-175 объединяют в 3-л мешке, и 300 мл AIM-V с 5% сыворотки АВ человека и 3000 МЕ/мл ІІ-2 добавляют в 300 мл суспензии ТІЛ. Количество клеток в каждом мешке может считаться каждый день или два и может добавляться свежая среда для поддержания отсчетов клеток в пределах примерно 0,5 и примерно $2,0 \times 10^6$ клеток/мл.

[0427] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение (включая размножение, упоминаемое как REP) осуществляют в колбах емкостью 500 мл с 100-см² газопроницаемым кремниевым дном (G-Rex 100, Wilson Wolf) (Фиг.1), примерно 5×10^6 или 10×10^6 ТІЛ культивируют вместе с облученными аллогенными РВМС при отношении 1:100 в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл ІІ-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂. В некоторых вариантах осуществления, в День 5, 250

мл супернатанта удаляют и помещают в центрифужные бутылки и центрифугируют при 1500 об/мин (491 g) в течение 10 минут. Затем осадки ТПЛ можно повторно суспендировать вместе с 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и добавлять обратно в исходные колбы G-Rex 100. В вариантах осуществления, где ТПЛ размножаются последовательно в колбах G-Rex 100, в День 7 ТПЛ в каждой G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждой колбе, и суспензию клеток разделяют на три аликвоты по 100 мл, которые используют для засева 3 колб G-Rex 100. Затем в каждую колбу добавляют 150 мл AIM-V с 5% сыворотки АВ человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Колбы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO₂ и через 4 дня добавляют 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в каждую колбу G-Rex 100. Клетки собирают в День 14 культивирования.

[0428] Разнообразные рецепторы антигенов Т- и В-лимфоцитов продуцируют посредством соматической рекомбинации ограниченного, но большого количества сегментов генов. Эти сегменты генов: V (вариабельный), D (D-сегмент), J (соединительный) и C (константный), определяют специфичность связывания и последующие применения иммуноглобулинов и рецепторов Т-клеток (TCR). Настоящее изобретение предлагает способ генерирования ТПЛ, которые демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ, полученные с помощью настоящего способа, демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ, полученные во втором размножении, демонстрируют повышение разнообразия репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, повышение разнообразия представляет собой повышение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия рецепторов Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие иммуноглобулина относится к тяжелой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие иммуноглобулина относится к легкой цепи иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие относится к рецептору Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, разнообразие относится к одному из рецепторов Т-клеток, выбранному из группы, состоящей из альфа-, бета-, гамма и дельта-рецепторов. В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования альфа- и/или бета-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования альфа-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования бета-рецепторов Т-клеток (TCR). В некоторых вариантах осуществления, имеется повышение экспрессирования TCRab (*то есть*, TCR α/β).

[0429] В некоторых вариантах осуществления, среда для культивирования, для второго размножения (*например*, иногда упоминаемая как CM2 или вторая среда для культивирования клеток), содержит ИЛ-2, ОКТ-3, а также антиген-презентирующие клетки-фидеры (APC), как обсуждается более подробно ниже.

[0430] В некоторых вариантах осуществления, второе размножение, например, Стадия D согласно Фигуре 9, осуществляется в биореакторе замкнутой системы. В некоторых вариантах осуществления, замкнутая система используется для размножения

ТП, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления, используемый единственный биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления, биореактор замкнутой системы представляет собой один биореактор.

1. Клетки-фидеры и антиген-презентирующие клетки

[0431] В одном из вариантов осуществления, процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе (например, включающего такое размножение, как описано на Стадии D Фигуры 9, а также упоминаемое как REP), требуют избытка клеток-фидеров в ходе REP размножения ТП и/или в ходе второго размножения. Во многих вариантах осуществления, клетки-фидеры представляют собой моноклеары периферической крови (PBMC), полученные из стандартных цельных единиц крови от здоровых доноров крови. PBMC получают используя стандартные способы, такие как разделение в градиенте Ficoll-Paque.

[0432] Как правило, аллогенные PBMC дезактивируются, с помощью либо облучения, либо термической обработки, и используются в процедурах REP, как описано в примерах, в частности, в примере 14, который приводит иллюстративный протокол оценки репликационной некомпетентности облученных аллогенных PBMC.

[0433] В некоторых вариантах осуществления, PBMC считаются репликационно некомпетентными и приемлемыми для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток в День 14 меньше чем начальное количество жизнеспособных клеток, вводимых в культуру в День 0 REP и/или в день 0 второго размножения (*то есть*, в день начала второго размножения). См. например, Пример 14.

[0434] В некоторых вариантах осуществления, PBMC считаются репликационно некомпетентными и приемлемыми для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и IL-2, в День 7 и День 14, не больше начального количества жизнеспособных клеток, вводимых в культуру в День 0 REP и/или День 0 второго размножения (*то есть*, в день начала второго размножения). В некоторых вариантах осуществления, PBMC культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела ОКТ3 и 3000 МЕ/мл IL-2. См. например, Пример 13.

[0435] В некоторых вариантах осуществления, PBMC считаются репликационно некомпетентными и приемлемыми для использования в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивируемых в присутствии ОКТ3 и IL-2, в День 7 и День 14, имеет количество жизнеспособных клеток, вводимых в культуру в День 0 REP и/или День 0 второго размножения (*то есть*, день начала второго размножения), не больше чем начальное количество. В некоторых вариантах осуществления, PBMC культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела ОКТ3 и 1000-6000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления,

РВМС культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-5000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления, РВМС культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела ОКТ3 и 2000-4000 МЕ/мл IL-2. В некоторых вариантах осуществления, РВМС культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела ОКТ3 и 2500-3500 МЕ/мл IL-2.

[0436] В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки-фидеры представляют собой РВМС. В некоторых вариантах осуществления, антиген-презентирующие клетки-фидеры представляют собой искусственные антиген-презентирующие клетки-фидеры. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к антиген-презентирующим клеткам-фидерам при втором размножении составляет примерно 1:25, примерно 1:50, примерно 1:100, примерно 1:125, примерно 1:150, примерно 1:175, примерно 1:200, примерно 1:225, примерно 1:250, примерно 1:275, примерно 1:300, примерно 1:325, примерно 1: 350, примерно 1:375, примерно 1: 400 или примерно 1:500. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к антиген-презентирующим клеткам-фидерам при втором размножении находится в пределах от 1:50 до 1:300. В одном из вариантов осуществления, отношение ТП к антиген-презентирующим клеткам-фидерам во втором размножении находится в пределах от 1:100 до 1:200.

[0437] В одном из вариантов осуществления, процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, требуют отношения примерно $2,5 \times 10^9$ клеток-фидеров примерно к 100×10^6 ТП. В другом варианте осуществления, процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, требуют отношения примерно $2,5 \times 10^9$ клеток-фидеров примерно к 50×10^6 ТП. Еще в одном варианте осуществления, процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, требуют отношения примерно $2,5 \times 10^9$ клеток-фидеров примерно к 25×10^6 ТП.

[0438] В одном из вариантов осуществления, процедуры второго размножения, описанные в настоящем документе, требуют избытка клеток-фидеров в ходе второго размножения. Во многих вариантах осуществления, клетки-фидеры представляют собой моноклеары периферической крови (РВМС), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. РВМС получают, используя стандартные способы, таких как разделение в градиенте Ficoll-Paque. В одном из вариантов осуществления, используются искусственные антиген-презентирующие (aAPC) клетки вместо РВМС.

[0439] Как правило, аллогенные РВМС являются дезактивированными, либо с помощью облучения, либо с помощью термической обработки, и используются в процедурах размножения ТП, описанных в настоящем документе, включая иллюстративные процедуры, описанные на Фигурах 4, 5, и 9.

[0440] В одном из вариантов осуществления, искусственные антиген-презентирующие клетки используются во втором размножении как замена, или в сочетании с РВМС.

2. Цитокины

[0441] Способы размножения, описанные в настоящем документе, как правило,

используют среды для культивирования с высокой дозой цитокинов, в частности, IL-2, как известно в данной области.

[0442] Альтернативно, можно дополнительно использовать сочетания цитокинов для быстрого размножения и/или для второго размножения ТП, включая сочетания двух или более цитокинов из IL-2, IL-15 и IL-21, как в целом описано в Международной публикации № WO 2015/189356 и в Международной публикации № WO 2015/189357, тем самым они в явном виде включаются в качестве ссылок во всей своей полноте. 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 находит особенное применение во многих вариантах осуществления. Использование сочетаний цитокинов конкретно способствует генерированию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как там описано.

3. Антитела анти-CD3

[0443] В некоторых вариантах осуществления, среды для культивирования, используемые в способах размножения, описанных в настоящем документе (включая упоминаемые как REP, смотри, например, Фигуру 9), также содержат антитело анти-CD3. Антитело анти-CD3 в сочетании с IL-2 индуцирует активирование Т-клеток и деление клеток в популяции ТП. Это воздействие можно увидеть для полноразмерных антител, а также для фрагментов Fab и F(ab')₂, при этом первые, как правило, являются предпочтительными; смотри, например, Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* 1985, 135, 1719, тем самым включаемую в качестве ссылки во всей ее полноте.

[0444] Как будет очевидно специалистам в данной области, имеется ряд пригодных для использования антител анти-CD3 человека, которые находят применения в настоящем изобретении, включая поликлональные и моноклональные антитела анти-CD3 человека от различных млекопитающих, включая, но, не ограничиваясь этим, антитела мышинных, человека, приматов, крыс и собачьих. В конкретных вариантах осуществления, используют антитело анти-CD3 ОКТ3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Raritan, NJ или Miltenyi Biotech, Auburn, CA).

[0445] В некоторых вариантах осуществления, антитело анти-CD3, такое как ОКТ3, может добавляться в культуру ТП за 2 дня, за 3 дня, за 4 дня или за 5 дней до стадии электропорообразования. В некоторых вариантах осуществления, антитело анти-CD3, такое как ОКТ3, может добавляться непосредственно до стадии электропорообразования. В некоторых вариантах осуществления, антитело анти-CD3, такое как ОКТ3, может добавляться непосредственно после стадии электропорообразования. В некоторых вариантах осуществления, антитело анти-CD3, такое как ОКТ3, может добавляться через 2 дня, 3 дня, 4 дня, или 5 дней после стадии электропорообразования.

4. Агонисты 4-1BB и OX40

[0446] Согласно одному из вариантов осуществления, среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB (CD137) и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого. Редактирование генома может осуществляться после введения агониста 4-1BB и/или агониста OX40 в среду для

культивирования клеток. Альтернативно, редактирование генома может осуществляться до введения агониста 4-1BB и/или агониста ОХ40 в среду для культивирования клеток.

[0447] Агонист 4-1BB может представлять собой любую молекулу, связывающуюся с 4-1BB, известную в данной области. Молекула, связывающаяся с 4-1BB, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, который может связываться с 4-1BB человека или млекопитающего. Агонисты 4-1BB или молекулы, связывающиеся с 4-1BB, 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 молекула, связывающаяся с 4-1BB, может содержать как тяжелую, так и легкую цепь. Как используется в настоящем документе, термин связывающаяся молекула включает также антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (*например*, биспецифичные антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, *например*, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, продуцируемые с помощью библиотеки экспрессирования Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любых соединений выше, и генно-инженерные формы антител, *например*, молекулы scFv, которые связываются с 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 способах и композициях по настоящему изобретению, включают антитела анти-4-1BB, антитела анти-4-1BB человека, антитела анти-4-1BB мыши, антитела анти-4-1BB млекопитающих, моноклональные антитела анти-4-1BB, поликлональные антитела анти-4-1BB, химерные антитела анти-4-1BB, аднектины анти-4-1BB, домены антител анти-4-1BB, одноцепочечные фрагменты анти-4-1BB, фрагменты тяжелой цепи анти-4-1BB, фрагменты легкой цепи анти-4-1BB, слитые белки анти-4-1BB и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биологически подобные соединения. Агонистические антитела анти-4-1BB, как известно, индуцируют сильные иммунные реакции. Lee, *et al.*, *PLOS One* 2013, 8, e69677. В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело анти-4-1BB (*то есть*, антитело, полученное из одной линии клеток). В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биологически подобное соединение. В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биологически подобное соединение.

[0448] В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB или молекула,

связывающаяся с 4-1BB, может также представлять собой слитый белок. В предпочтительном варианте осуществления, мультимерный агонист 4-1BB, такой как тримерный или гексамерный агонист 4-1BB (с тремя или шестью доменами связывания лигандов), может индуцировать превосходное образование рецепторных кластеров (4-1BBL) и образование внутреннего клеточного комплекса передачи сигналов по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое, как правило, содержит два домена связывания лигандов. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные) или большие слитые белки, содержащие три домена связывания TNFRSF и IgG1-Fc, и необязательное дополнительное связывание двух или более этих слитых белков описаны, например, в Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* 2013, 12, 2735-47.

[0449] Агонистические антитела к 4-1BB и слитые белки, как известно, индуцируют сильные иммунные реакции. В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфично связывается с антигеном 4-1BB способом эффективным для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок - агонистический к 4-1BB, который уничтожает антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC), например, цитотоксичность NK клеток. В некоторых вариантах осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок - агонистический к 4-1BB, который уничтожает антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок - агонистический к 4-1BB, который уничтожает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок - агонистический к 4-1BB, которое уничтожает функциональность Fc области.

[0450] В некоторых вариантах осуществления, агонисты 4-1BB отличаются связыванием с 4-1BB человека (SEQ ID NO:9) с высоким сродством и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с 4-1BB человека (SEQ ID NO:9). В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с 4-1BB мышиных (SEQ ID NO:10). Последовательности аминокислот антигена 4-1BB, с которым связывается агонист 4-1BB или связывающая молекула, приведены в Таблице 3.

Таблица 3. Последовательность аминокислот антигенов 4-1BB.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:9 4-1BB человека, элемент 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза	MGNSCYNIVA TLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180

опухоли, (Homo sapiens)	PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 4-1BB мышинных, элемент 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTFL LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[0451] В некоторых вариантах осуществления, описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 100 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 90 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 80 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 70 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 60 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 50 пМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 40 пМ или ниже или связывается с 4-1BB человека или мышинных с K_D примерно 30 пМ или ниже.

[0452] В некоторых вариантах осуществления, описанные композиции, процессы и способы, включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно $7,5 \times 10^5$ 1/М·сек или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно $7,5 \times 10^5$ 1/М·сек или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно 8×10^5 1/М·сек или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно $8,5 \times 10^5$ 1/М·сек или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно 9×10^5 1/М·сек или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно $9,5 \times 10^5$ 1/М·сек или быстрее или связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{assoc} примерно 1×10^6 1/М·сек или быстрее.

[0453] В некоторых вариантах осуществления, описанные композиции, процессы и способы, включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно 2×10^{-5} 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее или связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/сек или медленнее или связывается с 4-1BB человека или мышинных с k_{dissoc} примерно 3×10^{-5} 1/сек или медленнее.

[0454] В некоторых вариантах осуществления, описанные композиции, процессы и способы, включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 10 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 9 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 8 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 7 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 6 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 5 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 4 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 3 нМ или ниже, связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 2 нМ или ниже или связывается с 4-1BB человека или мышиных с IC_{50} примерно 1 нМ или ниже.

[0455] В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб, также известный как PF-05082566 или MOR-7480, или его фрагмент, производное, вариант или биологически подобное соединение. Утомилумаб является доступным от Pfizer, Inc. Утомилумаб представляет собой иммуноглобулин G2-лямбда анти-[TNFRSF9 *Homo sapiens* (элемент 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), 4-1BB, антиген Т-клеток ILA, CD137)], моноклональное антитело *Homo sapiens* (полностью человеческое). Последовательность аминокислот утомилумаба приводится в Таблице 4. Утомилумаб содержит сайты гликозилирования при Asn59 и Asn292; внутрицепные дисульфидные мостики 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}); внутрицепные дисульфидные мостики легкой цепи в положениях 22'-87' (V_H - V_L) и 136'-195' (C_{H1} - C_L); межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-тяжелая цепь в положениях изоформы IgG2A 218-218, 219-219, 222-222 и 225-225, в положениях изоформы IgG2A/B 218-130, 219-219, 222-222 и 225-225, и в положениях изоформы IgG2B 219-130 (2), 222-222 и 225-225; и межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-легкая цепь в положениях изоформы IgG2A 130-213' (2), в положениях изоформы IgG2A/B 218-213' и 130-213', и в положениях изоформы IgG2B 218-213' (2). Приготовление и свойства утомилумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №№ 8821867; 8337850 и 9468678 и в публикации заявки на Международный патент № WO 2012/032433 A1, описание каждой из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. Предклинические характеристики утомилумаба описаны в Fisher, *et al.*, *Cancer Immunolog. & Immunother.* 2012, 61, 1721-33. Современные клинические исследования утомилумаба при разнообразных показаниях гематологических и твердых опухолей включают U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identifiers NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 и NCT02554812.

[0456] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, описываемую SEQ ID NO:11, и легкую цепь, описываемую SEQ ID NO:12. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные переменные

фрагменты (scFv), варианты или их конъюгаты. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно.

[0457] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит CDR тяжелой и легкой цепи или переменные области (VR) утомилумаба. В одном из вариантов осуществления, переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:13, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:14, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит антитело scFv, содержащее области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14.

[0458] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16, и SEQ ID NO:17, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, 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, и их

консервативные замещения аминокислот.

[0459] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист 4-1BB одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на утомилумаб. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело 4-1BB, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и которая содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист 4-1BB, авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист 4-1BB предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. Антитело-агонист 4-1BB может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств, таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой утомилумаб.

Таблица 4. Последовательность аминокислот антител-агонистов 4-1BB, родственных утомилумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:11 тяжелая цепь для утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN Y 60 SPSFQGGQVTI 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 FNSTFRVVS 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC 420 SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP G 441
SEQ ID NO:12 легкая цепь для 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 для утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG KIYPGDSYTN 60 YSPSFQGQVT ISADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLTVTVSS 118
SEQ ID NO:14 вариабельная область легкой цепи для утомилумаба	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGSLAVFG GGTKLTVL 108
SEQ ID NO:15 CDR1 тяжелой цепи для утомилумаба	STYWIS 6
SEQ ID NO:16 CDR2 тяжелой цепи для утомилумаба	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
SEQ ID NO:17 CDR3 тяжелой цепи для утомилумаба	RGYGIFY 8
SEQ ID NO:18 легкая цепь CDR1 для утомилумаба	SGDNIGDQYA H 11
SEQ ID NO:19 CDR2 легкой цепи для утомилумаба	QDKNRPS 7
SEQ ID NO:20 CDR3 легкой цепи для утомилумаба	ATYTGFGSLA V 11

[0460] В предпочтительном варианте осуществления, агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело урелумаб, также известное как BMS-663513 и 20H4.9.h4a, или его фрагмент, производное, вариант или биологически подобное соединение. Урелумаб является доступным от Bristol-Myers Squibb, Inc., и Creative Biolabs, Inc. Урелумаб представляет собой иммуноглобулин G4-каппа анти-[TNFRSF9 *Homo sapiens* (элемент 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, 4-1BB, антиген ILA Т-клеток, CD137)], (полностью человеческое) моноклональное антитело *Homo sapiens*. Последовательность аминокислот урелумаба приводятся в Таблице 5. Урелумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 298 (и 298''); внутрицепные дисульфидные мостики 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''); внутрицепные дисульфидные мостики 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'''); межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-тяжелая цепь в положениях 227-227'' и 230-230''; и межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-легкая цепь при 135-216' и 135''-216'''. Приготовление и свойства урелумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №№ 7288638 и 8962804, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Предклинические и клинические характеристики урелумаба описаны в Segal, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>. Современные клинические исследования урелумаба при различных показаниях гематологических и твердых опухолей включают U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identifiers NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 и NCT01471210.

[0461] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, описываемую SEQ ID NO:21, и легкую цепь, описываемую SEQ ID NO:22. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагмент (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:21 и SEQ

ID NO:22, соответственно.

[0462] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит тяжелую и легкую цепь CDR или переменные области (VR) урелумаба. В одном из вариантов осуществления, переменная область (V_H) тяжелой цепи агониста 4-1BB содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:23, и переменная область (V_L) легкой цепи агониста 4-1BB содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:24, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной 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, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB содержит антитело scFv, содержащее области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24.

[0463] 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, и их консервативные замещения аминокислот, 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, и их консервативные замещения аминокислот.

[0464] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист 4-1BB, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на урелумаб. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело 4-1BB, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и она содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-

трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист 4-1BB авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист 4-1BB предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. антитело-агонист 4-1BB может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой урелумаб.

Таблица 5. Последовательность аминокислот антител-агонистов 4-1BB родственных урелумабу.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:21 тяжелая цепь для урелумаба	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSF S GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRTVIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVT SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPCCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 легкая цепь для урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180

	LTLISKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 вариабельная тяжелая цепь для урелумаба	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 вариабельная легкая цепь для урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110
SEQ ID NO:25 CDR1 тяжелой цепи для урелумаба	GYYSWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 тяжелой цепи для урелумаба	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 тяжелой цепи для урелумаба	DYGPNGYDWY FDL 13
SEQ ID NO:28 CDR1 легкой цепи для урелумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 CDR2 легкой цепи для урелумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 CDR3 легкой цепи для урелумаба	QQRSDWPPAL T 11

[0465] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB выбирается из группы, состоящей из 1D8, 3E1or, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), антитела, продуцируемого линией клеток, которое находится как депозит ATCC No. HB-11248 и описано в патенте США № 6974863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), антител, описанных в публикации заявки на патент США № US 2005/0095244, антител, описанных в патенте США № 7288638 (таких как 20H4.9-IgG1 (BMS-663031)), антител, описанных в патенте США № 6887673 (таких как 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 (таких как 4E9 или BMS-554271), антител, описанных в патенте США № 6362325 (таких как 1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3E1), антител, описанных в патенте США № 6974863 (таки как 53A2); антител, описанных в патенте США № 6210669 (таких как 1D8, 3B8 или 3E1), антител, описанных в патенте США № 5928893, антител,

описанных в патенте США № 6303121, антител, описанных в патенте США № 6569997, антител, описанных в публикациях заявок на Международные патенты №№ WO 2012/177788, WO 2015/119923 и WO 2010/042433, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов или биологически подобных соединений, где описание каждого из упомянутых выше патентов или публикаций заявок на патенты включается в настоящий документ в качестве ссылок.

[0466] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистический к 4-1BB слитый белок, описанный в публикациях заявок на Международные патенты №№ WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, и WO 2010/078966 A1; в публикациях заявок на патенты США №№ US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 и US 2015/0126710 A1; и в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0467] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистический к 4-1BB слитый белок как показано на Структуре I-A (слитый белок C-конечного фрагмента Fc-антитела) или на Структуре I-B (слитый белок N-конечного фрагмента Fc-антитела) на Фигуре 22, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант, или биологически подобное соединение.

[0468] На структурах I-A и I-B Фигуры 22, цилиндры относятся к индивидуальным доменам связывания полипептидов. Структуры I-A и I-B содержат три линейно связанных домена связывания TNFRSF, полученных, *например*, из 4-1BBL или из антитела, которое связывает 4-1BB, которые складываются с образованием трехвалентного белка, который затем связывается со вторым трехвалентным белком с помощью IgG1-Fc (включая домены C_H3 и C_H2), а затем используются для связывания двух трехвалентных белков вместе с помощью дисульфидных связей (малые продолговатые овалы), стабилизируя структуру и обеспечивая агонисты способные свести вместе внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием комплекса передачи сигналов. Домены связывания TNFRSF, маркированные как цилиндры, могут представлять собой домены scFv, содержащие, *например*, цепи V_H и V_L, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости. Можно использовать любой дизайн домена scFv, например, как описано 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 ссылках, включенных в настоящий документ в других местах. Структуры слитых белков в этой форме описаны в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0469] Последовательности аминокислот для других полипептидных доменов структуры I-A приводятся в Таблице 6. Домен Fc предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 из SEQ ID NO:31) полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 из SEQ ID NO:31) или часть шарнирного домена (*например*,

аминокислоты 4-16 из SEQ ID NO:31). Предпочтительные линкеры для соединения С-конечного Fc-антитела могут выбираться из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, включая линкеры пригодные для слияния дополнительных полипептидов.

Таблица 6. Последовательности аминокислот слитых белков TNFRSF, включая слитые белки 4-1BB, с С-конечным дизайном слитого белка фрагмента Fc-антитела (структура I-A).

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:31 Fc домен	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMIS RTP EVTCTVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV 180 LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 линкер	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 линкер	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 линкер	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 линкер	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 линкер	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:37 линкер	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO:38 линкер	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

[0470] Последовательности аминокислот для других полипептидных доменов структуры I-B описаны в Таблице 7. Если фрагмент Fc антитела сливается с N-окончанием слитого белка TNFRSF, как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно является такой, как показано в SEQ ID NO:42, а линкерные последовательности предпочтительно выбирают из их вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:43 to SEQ ID NO:45.

Таблица 7. Последовательности аминокислот слитых белков TNFRSF, включая слитые белки 4-1BB, с N-конечным дизайном слитого белка фрагмента Fc-антитела (структура I-B).

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:42 Fc домен	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME 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

[0471] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B Фигуры 22 содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, выбранных из группы, состоящей из вариabельной тяжелой цепи и вариabельной легкой цепи утомилумаба, вариabельной тяжелой цепи и вариabельной легкой цепи урелумаба, вариabельной тяжелой цепи и вариabельной легкой цепи утомилумаба, вариabельной тяжелой цепи и вариabельной легкой цепи, выбранной из вариabельных тяжелых цепей и вариabельных легких цепей, описанных в Таблице 8, из любого сочетания вариabельной тяжелой цепи и вариabельной легкой цепи, приведенного выше, и из их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биологически подобных соединений.

[0472] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B Фигуры 22 содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, содержащих последовательность 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:46. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, содержащих растворимую последовательность 4-1BBL. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:47.

[0473] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B на Фигуре 22 содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, которые представляет собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, которые

представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агониста 4-1BB согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания 4-1BB, которые представляют собой домены scFv, содержащие области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям V_H и V_L, приведенным в Таблице 8, где домены V_H и V_L соединены линкером.

Таблица 8. Дополнительные полипептидные домены пригодные для использования в качестве доменов связывания 4-1BB в слитых белках или в качестве антител scFv агонистов 4-1BB.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы 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 RLGVLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO:47 растворимый домен 4-1BBL	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVS LTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
SEQ ID NO:48 вариабельная тяжелая цепь для 4B4-1-1, версия 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 вариабельная легкая цепь для 4B4-1-1, версия 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 вариабельная тяжелая цепь для 4B4-1-1, версия 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 вариабельная легкая цепь для 4B4-1-1, версия 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 вариабельная тяжелая цепь для H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120

SEQ ID NO:53 вариабельная легкая цепь для H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110
--	---

[0474] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистический к 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен связывания 4-1BB, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен связывания 4-1BB, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен связывания 4-1BB, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конечном и/или C-конечном окончании, и где этот дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистический к 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен связывания 4-1BB, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен связывания 4-1BB, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен связывания 4-1BB, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конечном и/или C-конечном окончании, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, где в каждом из растворимых доменов 4-1BB отсутствует область стебля (которая вносит вклад в тримеризацию и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью домена связывания 4-1BB), и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[0475] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистический к 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен суперсемейства цитокинов фактор некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен суперсемейства цитокинов TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен суперсемейства цитокинов TNF, где в каждом из растворимых доменов суперсемейства цитокинов TNF отсутствует область стебля и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, и где каждый домен суперсемейства цитокинов TNF представляет собой домен связывания 4-1BB.

[0476] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой агонистическое к 4-1BB антитело scFv, содержащее любой из упомянутых выше доменов V_H, соединенный из любых из упомянутых выше доменов V_L.

[0477] В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB, BPS Bioscience catalog № 79097-2, коммерчески доступное от BPS Bioscience, San Diego, CA, USA. В одном из вариантов осуществления, агонист 4-1BB представляет собой антитело-агонист 4-1BB, Creative Biolabs catalog № MOM-18179, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Shirley, NY, USA.

[0478] Агонист OX40 (CD134) может представлять собой любую молекулу, связывающую OX40, известную в данной области. Молекула, связывающая OX40, может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способный связываться с

ОХ40 человека или млекопитающего. Агонисты ОХ40 или молекулы, связывающие ОХ40, 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 ОХ40 или молекула, связывающая ОХ40, могут иметь как тяжелую, так и легкую цепь. Как используется в настоящем документе, термин связывающая молекула также включает антитела (включая полноразмерные антитела), моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифичные антитела (*например*, биспецифичные антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела и фрагменты антител, *например*, фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты, получаемые с помощью библиотеки экспрессирования Fab, эпитоп-связывающие фрагменты любого из рассмотренных выше соединений и генно-инженерные формы антител, *например*, молекулы scFv, которые связываются с ОХ40. В одном из вариантов осуществления, агонист ОХ40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой полностью человеческое антитело. В одном из вариантов осуществления, агонист ОХ40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых вариантах осуществления, агонисты ОХ40 для использования в способах и композициях, описанных в настоящем изобретении, включают антитела анти-ОХ40, антитела анти-ОХ40 человека, антитела анти-ОХ40 мыши, антитела анти-ОХ40 млекопитающих, моноклональные антитела анти-ОХ40, поликлональные антитела анти-ОХ40, химерные антитела анти-ОХ40, аднектины анти-ОХ40, домены антител анти-ОХ40, одноцепочечные фрагменты анти-ОХ40, фрагменты тяжелых цепей анти-ОХ40, фрагменты легких цепей анти-ОХ40, слитые белки анти-ОХ40, и их фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биологически подобные соединения. В предпочтительном варианте осуществления, агонист ОХ40 представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело анти-ОХ40 (*то есть*, антитело, полученное от одной линии клеток).

[0479] В предпочтительном варианте осуществления, агонист ОХ40 или молекула, связывающая ОХ40, может также представлять собой слитый белок. Слитые белки ОХ40, содержащие домен Fc слитый с ОХ40L, описываются, *например*, в Sadun, *et al.*, *J. Immunother.* 2009, 182, 1481-89. В предпочтительном варианте осуществления, мультимерный агонист ОХ40, такой как тримерный или гексамерный агонист ОХ40 (с тремя или шестью доменами связывания лигандов), может индуцировать превосходящее образование кластеров рецепторов (ОХ40L) и образование внутреннего клеточного комплекса передачи сигналов по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое, как правило, имеет два домена связывания лигандов. Тримерные (трехвалентные) или гексамерные (или шестивалентные) или большие слитые белки, содержащие три домена связывания TNFRSF и IgG1-Fc, и необязательно, другие слитые белки, связывающие два или более из них, описаны, *например*, в Gieffers, *et al.*, *Mol. Cancer Therapeutics* 2013, 12, 2735-47.

[0480] Агонистические антитела OX40 и слитые белки, как известно, индуцируют сильные иммунные реакции. Curti, *et al.*, *Cancer Res.* 2013, 73, 7189-98. В предпочтительном варианте осуществления, агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, который специфично связывается с антигеном OX40 способом достаточным для уменьшения токсичности. В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 моноклональное антитело или слитый белок, который уничтожает антитело-зависимую клеточную токсичность (ADCC), например, цитотоксичность НК клеток. В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 моноклональное антитело или слитый белок, который уничтожает антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 моноклональное антитело или слитый белок, который уничтожает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 моноклональное антитело или слитый белок, который уничтожает функциональность Fc области.

[0481] В некоторых вариантах осуществления, агонисты OX40 характеризуются связыванием OX40 человека (SEQ ID NO:54) с высоким сродством и агонистической активностью. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывает OX40 человека (SEQ ID NO:54). В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывает OX40 мышиных (SEQ ID NO:55). Последовательности аминокислот антигена OX40, с которым связывается агонист OX40 или связывающая молекула приведены в Таблице 9.

Таблица 9. Последовательности аминокислот антигенов OX40.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:54 OX40 человека (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCHECRPGN GMVSRCRSRQ 60 NTVCRPCGP FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55 OX40 мышиных (Mus musculus)	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYP SGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60 HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTP EG PAFVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

связывает OX40 человека или мышинных с IC₅₀ примерно 1 нМ или ниже.

[0486] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой таволиксизумаб известный также как MEDI0562 или MEDI-0562. Таволиксизумаб является доступным от MedImmune, дочерней компании AstraZeneca, Inc. Таволиксизумаб представляет собой иммуноглобулин G1-каппа, гуманизированное и химерное моноклональное антитело анти-[TNFRSF4 *Homo sapiens* (элемент 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), OX40, CD134)]. Последовательности аминокислот таволиксизумаба приводятся в Таблице 10. Таволиксизумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 301 и 301'', с биантеннарными гликанами типа CHO фукозилированного комплекса; внутрицепные дисульфидные мостики тяжелой цепи в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_{H1}-C_L), 265-325 (C_{H2}) и 371-429 (C_{H3}) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'', и 371''-429''); внутрицепные дисульфидные мостики легкой цепи в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 134'-194' (C_{H1}-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 134'''-194'''); межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-тяжелая цепь в положениях 230-230'' и 233-233''; и межцепные дисульфидные мостики тяжелая цепь-легкая цепь при 224-214' и 224''-214''''. Современные клинические исследования таволиксизумаба при различных показаниях твердых опухолей включают U.S. National Institutes of Health clinicaltrials.gov identifiers NCT02318394 и NCT02705482.

[0487] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую цепь, описываемую SEQ ID NO:56, и легкую цепь, описываемую SEQ ID NO:57. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные переменные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно.

[0488] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелых и легких цепей таволиксизумаба. В одном из вариантов осуществления, переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40

содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:58, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:59, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит антитело scFv, содержащее области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59.

[0489] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 и SEQ ID NO:65, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот.

[0490] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на таволиксизумаб. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и она содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист OX40 авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист OX40 предлагается в препарате,

который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. Антитело-агонист OX40 может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб.

Таблица 10. Последовательности аминокислот антител-агонистов OX40 родственных таволиксизумаба.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:56 тяжелая цепь для таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTSLTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDSFLL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:57 легкая цепь для таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:58 вариабельная область тяжелой	QVQLQESGPG LVKPSQTLST TCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTSLTV 118

цепи для таволиксизумаба	
SEQ ID NO:59 вариабельная область легкой цепи для таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 CDR1 тяжелой цепи для таволиксизумаба	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 CDR2 тяжелая цепь для таволиксизумаба	YIGYISYNGI TYH 13
SEQ ID NO:62 CDR3 тяжелой цепи для таволиксизумаба	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 CDR1 легкой цепи для таволиксизумаба	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 CDR2 легкой цепи для таволиксизумаба	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 CDR3 легкой цепи для таволиксизумаба	QQGSALPW 8

[0491] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой 11D4, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Приготовление и свойства 11D4 описаны в патентах США №№ 7960515; 8236930 и 9028824, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот 11D4 приводятся в Таблице 11.

[0492] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую цепь, описываемую SEQ ID NO:66, и легкую цепь, описываемую SEQ ID NO:67. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов

осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно.

[0493] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелых и легких цепей 11D4. В одном из вариантов осуществления, переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:68, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:69, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно.

[0494] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71, и SEQ ID NO:72, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, и SEQ ID NO:75, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот.

[0495] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на 11D4. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и она содержит одну

или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист OX40, авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист OX40 предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. Антитело-агонист OX40 может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 11D4.

Таблица 11. Последовательности аминокислот антител-агонистов OX40 родственных 11D4.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:66 тяжелая цепь для 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPCPCAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444

SEQ ID NO:67 легкая цепь для 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 вариабельная область тяжелой цепи для 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 вариабельная область легкой цепи для 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 CDR1 тяжелой цепи для 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 CDR2 тяжелой цепи для 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 CDR3 тяжелой цепи для 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 CDR1 легкой цепи для 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 CDR2 легкой цепи для 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 CDR3 легкой цепи для 11D4	QQYNSYPPT 9

[0496] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой 18D8, которое представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Приготовление и свойства 18D8 описаны в патентах США №№ 7960515; 8236930 и 9028824, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот 18D8 приводятся в Таблице 12.

[0497] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую цепь, описываемую SEQ ID NO:76, и легкую цепь, описываемую SEQ ID NO:77. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, имеющие последовательности, показанные в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно, или их антигенсвязывающие фрагменты, фрагменты Fab, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), варианты или конъюгаты. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и

легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепи, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно.

[0498] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит CDR или переменные области (VR) тяжелых и легких цепей 18D8. В одном из вариантов осуществления, переменная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:78, и переменная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:79, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно.

[0499] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84, и SEQ ID NO:85, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот.

[0500] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств, со ссылкой на 18D8. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100%

идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и она содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист OX40, авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист OX40 предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. Антитело-агонист OX40 может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой 18D8.

Таблица 12. Последовательности аминокислот антител-агонистов OX40, родственных 18D8.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:76 тяжелая цепь для 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYFG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450

SEQ ID NO:77 легкая цепь для 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYF REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSTLTTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 вариабельная область тяжелой цепи для 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 вариабельная область легкой цепи для 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 тяжелой цепи для 18D8	DYAMH 5
SEQ ID NO:81 CDR2 тяжелой цепи для 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO:82 CDR3 тяжелой цепи для 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO:83 CDR1 легкой цепи для 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:84 CDR2 легкой цепи для 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO:85 18D8 легкой цепи CDR3 для	QQRSNWPT 8

[0501] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой Hu119-122, которое представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Приготовление и свойства Hu119-122 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации Международного патента № WO 2012/027328, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот Hu119-122 приводятся в Таблице 13.

[0502] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей Hu119-122. В одном из вариантов осуществления, вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:86, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:87, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном

из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно.

[0503] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, и SEQ ID NO:90, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92, и SEQ ID NO:93, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот.

[0504] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на Hu119-122. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, и она содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист OX40, авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист OX40 предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. Антитело-агонист OX40 может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или

эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu119-122.

Таблица 13. Последовательности аминокислот антител-агонистов OX40 родственных Hu119-122.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:86 вариабельная область тяжелой цепи для HU119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFV SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTVSS 120
SEQ ID NO:87 вариабельная область легкой цепи для HU119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHVY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 тяжелой цепи для HU119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 тяжелой цепи для HU119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 CDR3 тяжелой цепи для HU119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 CDR1 легкой цепи для HU119-122	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 CDR2 легкой цепи для HU119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 CDR3 легкой цепи для HU119-122	QHSRELPLT 9

[0505] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой Hu106-222, которое представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Приготовление и свойства Hu106-222 описаны в патентах США №№ 9006399 и 9163085 и в публикации Международного патента № WO 2012/027328, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот Hu106-222 приводятся в Таблице 14.

[0506] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит тяжелую и легкую цепь CDR или вариабельные области (VR) Hu106-222. В одном из вариантов

осуществления, вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:94, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста OX40 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO:95, и их консервативные замещения аминокислот. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 99% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 98% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 97% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 96% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательности, показанной в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно.

[0507] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, и SEQ ID NO:98, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи, имеющие последовательности, приведенные в SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100, и SEQ ID NO:101, соответственно, и их консервативные замещения аминокислот.

[0508] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой биологически подобное моноклональное антитело-агонист OX40, одобренное регуляторными органами для лекарственных средств со ссылкой на Hu106-222. В одном из вариантов осуществления, биологически подобное моноклональное антитело содержит антитело OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая имеет, по меньшей мере, 97% идентичность последовательности, *например*, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность последовательности, с последовательностью аминокислот эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта и она содержит одну или несколько пост-трансляционных модификаций по сравнению с эталонным лекарственным препаратом или эталонным биологическим продуктом, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления, одна или несколько пост-трансляционных модификаций выбираются из одного или нескольких действий из: гликозилирования, окисления, деамидирования и усечения. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобным является антитело-агонист OX40, авторизованное или представленное для авторизации, где антитело-агонист OX40 предлагается в препарате, который отличается от препаратов эталонного лекарственного продукта или эталонного биологического продукта, где эталонный лекарственный продукт или эталонный

биологический продукт представляет собой Hu106-222. Антитело-агонист OX40 может быть авторизовано регуляторным органом для лекарственных средств таким как U.S. FDA и/или European Union's EMA. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222. В некоторых вариантах осуществления, биологически подобное соединение предлагается как композиция, которая дополнительно содержит один или несколько наполнителей, где один или несколько наполнителей являются такими же или отличаются от наполнителей, содержащихся в эталонном лекарственном продукте или эталонном биологическом продукте, где эталонный лекарственный продукт или эталонный биологический продукт представляет собой Hu106-222.

Таблица 14. Последовательности аминокислот антител-агонистов OX40 родственных Hu106-222.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:94 вариабельная область тяжелой цепи для HU106- 222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:95 вариабельная область легкой цепи для HU106- 222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 тяжелой цепи для HU106-222	DYSMH 5
SEQ ID NO:97 CDR2 тяжелой цепи для HU106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 CDR3 тяжелой цепи для HU106-222	PYYDYVSYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 легкой цепи для HU106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100 CDR2 легкой цепи для HU106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO:101 CDR3 легкой цепи для HU106-222	QQHYSTPRT 9

[0509] В некоторых вариантах осуществления, агонист антитела OX40 представляет собой MEDI6469 (также упоминаемый как 9B12). MEDI6469 представляет собой моноклональное антитело мышинных. Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.* 2006, 29, 575-585. В некоторых вариантах осуществления агонист OX40 представляет собой антитело, продуцируемое гибридомой 9B12, находится как депозит в Biovest Inc. (Malvern, MA, USA), как описано в Weinberg, *et al.*, *J. Immunother.* 2006, 29, 575-585, описание которой тем самым включается в качестве ссылки во всей их полноте. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит последовательности CDR MEDI6469. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи MEDI6469.

[0510] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой L106 BD (Pharmingen Product #340420). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 содержит CDR антитела L106 (BD Pharmingen Product #340420). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела L106 (BD Pharmingen Product #340420). В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 содержит CDR антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073). В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Catalog #20073). В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело анти-mCD134/mOX40 мышинных (клон OX86), коммерчески доступное от InVivoMAb, BioXcell Inc, West Lebanon, NH.

[0511] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 выбирается из агонистов OX40, описанных в публикациях Международных заявок на патент №№ WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 и WO 2014/148895; в заявке на Европейский патент EP 0672141; в публикациях заявок на патент США №№ US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 и US 2015/132288 (включая клоны 20E5 и 12H3); и в патентах США №№ 7504101, 7550140, 7622444, 7696175, 7960515, 7961515, 8133983, 9006399 и 9163085, описание каждого из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки во всей своей полноте.

[0512] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистический к OX40 слитый белок как изображено на Структуре I-A (слитый белок С-конечного фрагмента Fc-антитела) или на Структуре I-B (слитый белок N-конечного Fc-фрагмента антитела), или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биологически подобное соединение. Свойства структур I-A и I-B описаны выше и в патентах США №№ 9359420, 9340599, 8921519 и 8450460, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Последовательности аминокислот для полипептидных доменов структуры I-A приведены в Таблице 6. Домен Fc предпочтительно содержит

полный константный домен (аминокислоты 17-230 из SEQ ID NO:31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 из SEQ ID NO:31) или часть шарнирного домена (*например*, аминокислоты 4-16 из SEQ ID NO:31). Предпочтительные линкеры для соединения С-конечного Fc-антитела могут выбираться из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, включая линкеры пригодные для слияния дополнительных полипептидов. Подобным же образом, последовательности аминокислот для полипептидных доменов структуры I-B приводятся в Таблице 7. Если фрагмент Fc антитела сливается с N-окончанием слитого белка TNRFSF как в структуре I-B, последовательность модуля Fc предпочтительно такая, как показано в SEQ ID NO:42, и линкерные последовательности предпочтительно выбираются из вариантов осуществления, приведенных в SEQ ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

[0513] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, выбранных из группы, состоящей из вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи таволиксизумаба, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи 11D4, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи 18D8, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи Hu119-122, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи Hu106-222, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, выбранной из вариабельных тяжелых цепей и вариабельных легких цепей, описанных в Таблице 15, из любого сочетания вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи из упомянутых выше, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биологически подобных соединений.

[0514] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, содержащих последовательность OX40L. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:102. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:103. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, содержащих последовательность согласно SEQ ID NO:104.

[0515] В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L , которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из

вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой scFv домен, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям, показанным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно, где домены V_H и V_L соединены линкером. В одном из вариантов осуществления, слитый белок - агонист OX40 согласно структурам I-A или I-B содержит один или несколько доменов связывания OX40, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, которые, каждая, по меньшей мере, на 95% идентичны последовательностям V_H и V_L приведены в Таблице 15, где домены V_H и V_L соединены линкером.

Таблица 15. Дополнительные полипептидные домены пригодные в качестве доменов связывания OX40 в слитых белках (*например*, в структурах I-A и I-B) или в качестве scFv антител-агонистов OX40.

Идентификатор	Последовательность (однобуквенные символы аминокислот)
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYS QEVNLSLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 OX40L растворимый домен	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYSQE 60 VNLSLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 OX40L растворимый	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLSL KGYFSQEVNI 60

домен (альтернатива)	SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVT DNTSLDDFHV NGGELILHQ 120 NPGEFCVL 128
SEQ ID NO:105 вариабельная тяжелая цепь для 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGT LTVS 120
SEQ ID NO:106 вариабельная легкая цепь для 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 вариабельная тяжелая цепь для 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYT MNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGT LTVSSA 120
SEQ ID NO:108 вариабельная легкая цепь для 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 вариабельная тяжелая цепь для 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGT LTVS 120
SEQ ID NO:110 вариабельная легкая цепь для 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 вариабельная тяжелая цепь для 023	EVQLVESGGG LVHPPGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFYDW GQGT LTVSS 120
SEQ ID NO:112 вариабельная легкая цепь для 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:113 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANY GSSLMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 вариабельная область легкой цепи	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGT VKLLIY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYT MHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKD KATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPLHDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 вариабельная область легкой цепи	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108

SEQ ID NO:117 вариабельная область тяжелой цепи человеческого антитела	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLIKND TATYFCANPY YDYVSYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 вариабельная область тяжелой цепи человеческого антитела	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTSTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 вариабельная область легкой цепи человеческого антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 вариабельная область легкой цепи человеческого антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:121 вариабельная область тяжелой цепи человеческого антитела	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 вариабельная область тяжелой цепи человеческого антитела	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:123 вариабельная область легкой цепи человеческого антитела	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 вариабельная область легкой цепи человеческого антитела	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 вариабельная область тяжелой цепи	MYLGLNYVFI VFLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAE DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWGQ GTTLTVSS 138
SEQ ID NO:126 вариабельная область легкой цепи	MRPSIQFLGL LLFWLHGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[0516] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой

агонистический к OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен связывания OX40, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен связывания OX40, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен связывания OX40, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конечном и/или C-конечном окончании, и где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc. В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистический к OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен связывания OX40, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен связывания OX40, (iv) второй пептидный линкер, и (v) третий растворимый домен связывания OX40, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конечном и/или C-конечном окончании, где дополнительный домен представляет собой домен фрагмента Fab или Fc, где в каждом из растворимых доменов связывания OX40 отсутствует область стебля (который вносит вклад в тримеризацию и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, но не является частью домена связывания OX40) и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[0517] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистический к OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен суперсемейства цитокинов фактор некроза опухоли (TNF), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен суперсемейства цитокинов TNF, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый домен суперсемейства цитокинов TNF, где в каждом из растворимых доменов суперсемейства цитокинов TNF отсутствует область стебля и первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, и где домен суперсемейства цитокинов TNF представляет собой домен связывания OX40.

[0518] В некоторых вариантах осуществления, агонист OX40 представляет собой MEDI6383. MEDI6383 представляет собой агонистический к OX40 слитый белок, и его можно получить, как описано в патенте США № 6312700, описание которого включается в настоящий документ в качестве ссылки.

[0519] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 антитело scFv, содержащее любой из упомянутых выше доменов V_H связанный с любым из упомянутых выше доменов V_L .

[0520] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой агонистическое к OX40 моноклональное антитело MOM-18455, Creative Biolabs, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Inc., Shirley, NY, USA.

[0521] В одном из вариантов осуществления, агонист OX40 представляет собой клон Ber-ACT35 агонистического к OX40 антитела, коммерчески доступный от BioLegend, Inc., San Diego, CA, USA.

Е. СТАДИЯ Е: Сбор TIL

[0522] После стадии второго размножения, клетки можно собирать. В некоторых вариантах осуществления TIL собирают после одной, двух, трех, четырех или более стадий

размножения, например, как приводится на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления ТП собирают после двух стадий размножения, например, как приведено на Фигуре 9.

[0523] ТП можно собирать любым соответствующим и стерильным образом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора ТП хорошо известны в данной области и любой такой известный способ может использоваться вместе со способом по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, ТП собирают, используя автоматизированной системы.

[0524] Клеточные харвестеры и/или системы процессирования клеток являются коммерчески доступными из разнообразных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech BioSystems International, Inc. Любой харвестер на клеточной основе можно использовать в способах по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клеточный харвестер и/или системы процессирования клеток представляет собой мембранный клеточный харвестер. В некоторых вариантах осуществления, сбор клеток осуществляется с помощью системы процессирования клеток, такой как система LOVO (производится Fresenius Kabi). Термин “система процессирования клеток LOVO” также относится к любому инструменту или устройству, произведенному любым производителем, которое может прокачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, такой как центробежная мембрана или центробежный фильтр, в окружающей среде стерильной и/или замкнутой системы, делающей возможным непрерывный поток и процессирование клеток для удаления супернатанта или сред для культивирования клеток без образования осадка. В некоторых вариантах осуществления, клеточный харвестер и/или система процессирования клеток может осуществлять разделение клеток, промывку, замену текучих сред, концентрирование, и/или другие стадии процессирования клеток в замкнутой стерильной системе.

[0525] В некоторых вариантах осуществления, сбор, например, Стадия Е согласно Фигуре 9, осуществляется в биореакторе замкнутой системы. В некоторых вариантах осуществления, замкнутая система используется для размножения ТП, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, используется один биореактор. В некоторых вариантах осуществления, используемый один биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. В некоторых вариантах осуществления, биореактор замкнутой системы представляет собой один биореактор.

F. СТАДИЯ F: конечное приготовление и перенос в инфузионный мешок

[0526] После завершения Стадий А - Е, как приводится, в порядке иллюстрации на Фигуре 9 и как показано подробно выше и в настоящем документе, клетки переносятся в контейнер для использования при введении пациенту. В некоторых вариантах осуществления, после получения терапевтически достаточного количества ТП, используя способы размножения, описанные выше, они переносятся в контейнер для использования при введении пациенту.

[0527] В одном из вариантов осуществления, ТП, размноженные используя АРС по настоящему описанию, вводятся пациенту в качестве фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, размноженные используя РВМС по настоящему описанию, могут вводиться любым пригодным для использования способом, как известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки вводятся как одна внутриартериальная или внутривенная инфузия, которая предпочтительно продолжается приблизительно 30-60 минут. Другие соответствующие способы введения включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрелимфатическое.

Г. Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

[0528] В одном из вариантов осуществления, ТП, размноженные используя способы по настоящему описанию, вводятся пациенту в качестве фармацевтической композиции. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой суспензию ТП в стерильном буфере. ТП, размноженные используя РВМС по настоящему изобретению, могут вводиться с помощью любого пригодного для использования способа, как известно в данной области. В некоторых вариантах осуществления, Т-клетки вводятся с помощью одной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно продолжается приблизительно 30-60 минут. Другие пригодные для использования способы введения включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрелимфатическое введение.

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

6×10^{10} примерно до 8×10^{10} ТП. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективная доза составляет примерно от 7×10^{10} примерно до 8×10^{10} ТП.

[0530] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему 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 ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, находится в пределах 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} .

[0531] В некоторых вариантах осуществления, концентрация ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, например, меньше 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/объем или объем/объем от фармацевтической композиции.

[0532] В некоторых вариантах осуществления, концентрация ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, больше 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25% 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25% 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25% 2%, 1,75%, 1,50%, 1,25%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% масс/масс, масс/объем или объем/объем от фармацевтической композиции.

[0533] В некоторых вариантах осуществления, концентрация ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, находится в пределах примерно от 0,0001% примерно до 50%, примерно от 0,001% примерно до 40%, примерно от 0,01% примерно до 30%, примерно от 0,02% примерно до 29%, примерно от 0,03% примерно до 28%, примерно от 0,04% примерно до 27%, примерно от 0,05% примерно до

26%, примерно от 0,06% примерно до 25%, примерно от 0,07% примерно до 24%, примерно от 0,08% примерно до 23%, примерно от 0,09% примерно до 22%, примерно от 0,1% примерно до 21%, примерно от 0,2% примерно до 20%, примерно от 0,3% примерно до 19%, примерно от 0,4% примерно до 18%, примерно от 0,5% примерно до 17%, примерно от 0,6% примерно до 16%, примерно от 0,7% примерно до 15%, примерно от 0,8% примерно до 14%, примерно от 0,9% примерно до 12% или примерно от 1% примерно до 10% масс/масс, масс/объем или объем/объем от фармацевтической композиции.

[0534] В некоторых вариантах осуществления, концентрация ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, находится в пределах примерно от 0,001% примерно до 10%, примерно от 0,01% примерно до 5%, примерно от 0,02% примерно до 4,5%, примерно от 0,03% примерно до 4%, примерно от 0,04% примерно до 3,5%, примерно от 0,05% примерно до 3%, примерно от 0,06% примерно до 2,5%, примерно от 0,07% примерно до 2%, примерно от 0,08% примерно до 1,5%, примерно от 0,09% примерно до 1%, примерно от 0,1% примерно до 0,9% масс/масс, масс/объем или объем/объем от фармацевтической композиции.

[0535] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению равно или меньше чем 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

[0536] В некоторых вариантах осуществления, количество ТП, предлагаемых в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, больше чем 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5 г, 3 г, 3,5 г, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[0537] ТП, предлагаемые в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, являются эффективными в широком диапазоне дозировок. Конкретная доза будет зависеть от способа введения, от формы, в которой соединение вводится, от пола и возраста субъекта, который должен лечиться, от массы тела субъекта, который должен лечиться, и от предпочтения и опыта наблюдающего врача. Клинически установленные дозы ТП также можно использовать, при необходимости. Количества фармацевтических композиций, вводимых используя способы по настоящему изобретению, такие как дозировки ТП, будут зависеть от человека или млекопитающего, которое лечат, от тяжести расстройства или состояния, интенсивности введения, диспозиции активных

фармацевтических ингредиентов и от опыта предписывающего врача.

[0538] В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ могут вводиться в одной дозе. Такое введение может осуществляться посредством инъекции, *например*, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ могут вводиться во множестве доз. Дозирование может осуществляться один, два, три раза, четыре раза, пять раз, шесть раз или больше шести раз в год. Дозирование может осуществляться раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю или через день. Введение ТПЛ может продолжаться настолько долго, насколько это необходимо.

[0539] В некоторых вариантах осуществления, эффективная доза ТПЛ 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 ТПЛ находится в пределах 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} .

[0540] В некоторых вариантах осуществления, эффективная доза ТПЛ находится в пределах примерно от 0,01 мг/кг примерно до 4,3 мг/кг, примерно от 0,15 мг/кг примерно до 3,6 мг/кг, примерно от 0,3 мг/кг примерно до 3,2 мг/кг, примерно от 0,35 мг/кг примерно до 2,85 мг/кг, примерно от 0,15 мг/кг примерно до 2,85 мг/кг, примерно от 0,3 мг/кг примерно до 2,15 мг/кг, примерно от 0,45 мг/кг примерно до 1,7 мг/кг, примерно от 0,15 мг/кг примерно до 1,3 мг/кг, примерно от 0,3 мг/кг примерно до 1,15 мг/кг, примерно от 0,45 мг/кг примерно до 1 мг/кг, примерно от 0,55 мг/кг примерно до 0,85 мг/кг, примерно от 0,65 мг/кг примерно до 0,8 мг/кг, примерно от 0,7 мг/кг примерно до 0,75 мг/кг, примерно от 0,7 мг/кг примерно до 2,15 мг/кг, примерно от 0,85 мг/кг примерно до 2 мг/кг, примерно от 1 мг/кг примерно до 1,85 мг/кг, примерно от 1,15 мг/кг примерно до 1,7 мг/кг, примерно от 1,3 мг/кг мг примерно до 1,6 мг/кг, примерно от 1,35 мг/кг примерно до 1,5 мг/кг, примерно от 2,15 мг/кг примерно до 3,6 мг/кг, примерно от 2,3 мг/кг примерно до 3,4 мг/кг, примерно от 2,4 мг/кг примерно до 3,3 мг/кг, примерно от 2,6 мг/кг примерно до 3,15 мг/кг, примерно от 2,7 мг/кг примерно до 3 мг/кг, примерно от 2,8 мг/кг примерно до 3 мг/кг или примерно от 2,85 мг/кг примерно до 2,95 мг/кг.

[0541] В некоторых вариантах осуществления, эффективная доза ТПЛ находится в пределах примерно от 1 мг примерно до 500 мг, примерно от 10 мг примерно до 300 мг, примерно от 20 мг примерно до 250 мг, примерно от 25 мг примерно до 200 мг, примерно от 1 мг примерно до 50 мг, примерно от 5 мг примерно до 45 мг, примерно от 10 мг примерно до 40 мг, примерно от 15 мг примерно до 35 мг, примерно от 20 мг примерно до 30 мг, примерно от 23 мг примерно до 28 мг, примерно от 50 мг примерно до 150 мг,

примерно от 60 мг примерно до 140 мг, примерно от 70 мг примерно до 130 мг, примерно от 80 мг примерно до 120 мг, примерно от 90 мг примерно до 110 мг или примерно от 95 мг примерно до 105 мг, примерно от 98 мг примерно до 102 мг, примерно от 150 мг примерно до 250 мг, примерно от 160 мг примерно до 240 мг, примерно от 170 мг примерно до 230 мг, примерно от 180 мг примерно до 220 мг, примерно от 190 мг примерно до 210 мг, примерно от 195 мг примерно до 205 мг или примерно от 198 примерно до 207 мг.

[0542] Эффективное количество ТПЛ может вводиться либо в одной, либо во множестве доз с помощью любого из принятых режимов введения агентов, имеющих сходное применение, включая интраназальный и трансдермальный способы, внутриаартериальную инъекцию, внутривенно, внутривентриально, парентерально, внутримышечно, подкожно, местным образом, посредством трансплантации или посредством ингаляции.

Н. Криоконсервирование ТПЛ

[0543] Как обсуждается выше, и иллюстрируется на Стадиях А - Е согласно Фигуре 9, криоконсервирование может осуществляться во множестве точек в процессе размножения ТПЛ. В некоторых вариантах осуществления, может криоконсервироваться размноженная популяция ТПЛ после второго размножения (как предлагается, например, согласно Стадии D Фигуры 9). Криоконсервирование, как правило, может осуществляться посредством помещения популяции ТПЛ в раствор для замораживания, *например*, из 85% комплемент-дезактивированной сыворотки АВ и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C , с необязательным переносом в морозилки с газообразным азотом для криоконсервирования. Смотри Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ криоконсервируются в 5% DMSO. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ криоконсервируются в средах для культивирования клеток плюс 5% DMSO. В некоторых вариантах осуществления, ТПЛ криоконсервируются согласно способам, предложенным в Примерах 8 и 9.

[0544] При необходимости клетки удаляют из морозилки и оттаивают на водяной бане при 37°C пока не оттаит приблизительно 4/5 раствора. Клетки, как правило, повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или несколько раз. В некоторых вариантах осуществления, оттаянные ТПЛ могут считаться и оцениваться на жизнеспособность, как известно в данной области.

I. Замкнутые системы для получения ТПЛ

[0545] Настоящее изобретение предлагает использование замкнутых систем в ходе процесса культивирования ТПЛ. Такие замкнутые системы позволяют предотвратить и/или уменьшить микробное загрязнение, позволяют использовать меньше колб и позволяют сократить затраты. В некоторых вариантах осуществления, замкнутая система использует два контейнера.

[0546] Такие замкнутые системы хорошо известны в данной области и их можно, например, найти по адресу <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm> и

<https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>..

[0547] Как приводится на сайте FDA, замкнутые системы со стерильными способами известны и хорошо описаны. Смотри, <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>, как упоминается выше и приводится в соответствующей части ниже.

[0548] Стерильные соединительные устройства (STCD) осуществляют стерильные сварные швы между двумя фрагментами совместимых труб. Эта процедура делает возможным стерильное соединение множество контейнеров и трубок разных диаметров. Эта инструкция описывает рекомендуемые практики и процедуры для использования в этих устройствах. Эта инструкция не приводит данных или информации, которую производитель стерильного соединительного устройства должен направлять FDA для получения одобрения или разрешения поставки на рынок. Важно также отметить, что использование одобренного или разрешенного стерильного соединительного устройства для целей, не авторизованных на этикетке, может заставить считать устройство неправильно используемым и не соответствующим его назначению согласно Federal Food, Drug and Cosmetic Act.

[0549] В некоторых вариантах осуществления, замкнутая система использует один контейнер от момента получения фрагментов опухоли и до готовности TIL для введения пациенту или до криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, первый контейнер представляет собой замкнутый G-контейнер и популяцию TIL центрифугируют и переносят в инфузионный мешок без открывания первого замкнутого G-контейнера. В некоторых вариантах осуществления, когда используются два контейнера, инфузионный мешок представляет собой инфузионный мешок, содержащий Hypothermosol. Замкнутая система или замкнутая система для культивирования клеток TIL отличается тем, что после добавления образца опухоли и/или фрагментов опухоли, система плотно герметизируется снаружи для формирования замкнутой окружающей среды, свободной от инвазии бактерий, грибов и/или любого другого микробного загрязнения.

[0550] В некоторых вариантах осуществления, уменьшение микробного загрязнения находится в пределах примерно между 5% и примерно 100%. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение микробного загрязнения находится в пределах примерно между 5% и примерно 95%. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение микробного загрязнения находится в пределах примерно между 5% и примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение микробного загрязнения находится в пределах примерно между 10% и примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение микробного загрязнения находится в пределах примерно между 15% и примерно 85%. В некоторых вариантах осуществления, уменьшение 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%.

[0551] Замкнутая система делает возможным рост ТП в отсутствии и/или при значительном сокращении микробного загрязнения.

[0552] Кроме того, каждый параметр из рН, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода окружающей среды культуры клеток ТП изменяется, когда культивируются клетки. Несмотря на то, что среда, соответствующая культивированию клеток, циркулирует, замкнутая окружающая среда по-прежнему должна поддерживаться непрерывно как оптимальная окружающая среда для пролиферации ТП. Для этого, является желательным, чтобы физические факторы рН, парциального давления диоксида углерода и парциального давления кислорода жидкости для культивирования замкнутой окружающей среды отслеживались посредством сенсора, сигнал которого используется для контроля газообменника, установленного на входе окружающей среды для культивирования, и чтобы парциальное давление газов замкнутой окружающей среды регулировалось в реальном времени в соответствии с изменениями в жидкости для культивирования, для оптимизации окружающей среды для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает замкнутую систему для культивирования клеток, которая содержит на входе в замкнутую окружающую среду газообменник, снабженный отслеживающим устройством, которое измеряет рН, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода замкнутой окружающей среды и оптимизирует окружающую среду для культивирования клеток посредством автоматической регулировки концентраций газов на основе сигналов от отслеживающего устройства.

[0553] В некоторых вариантах осуществления, давление в замкнутой окружающей среде непрерывно или периодически контролируется. То есть, давление в замкнутой окружающей среде может изменяться, например, посредством устройства для поддержания давления, обеспечивая таким образом пригодность пространства для роста ТП в состоянии с положительным давлением или способствуя удалению текучей среды в состоянии с отрицательным давлением и таким образом способствуя пролиферации клеток. Кроме того, прикладывая периодически отрицательное давление, можно однородно и эффективно заменять циркулирующую жидкость в замкнутой окружающей среде посредством временного уменьшения объема замкнутой окружающей среды.

[0554] В некоторых вариантах осуществления, могут замещаться или добавляться оптимальные компоненты культуры для пролиферации ТП, включая такие факторы, как ПЛ-2 и/или ОКТЗ, а также их сочетания, которые могут добавляться.

С. Культуры клеток

[0555] В одном из вариантов осуществления, способы размножения ТП, включая обсуждаемые выше, а также иллюстрируемые на Фигуре 9, могут включать использование

примерно от 5000 мл примерно до 25000 мл среды для культивирования клеток, примерно от 5000 мл примерно до 10000 мл среды для культивирования клеток или примерно от 5800 мл примерно до 8700 мл среды для культивирования клеток. В некоторых вариантах осуществления, среда представляет собой бессывороточную среду. В некоторых вариантах осуществления, среда в первом размножении является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, среда при втором размножении является бессывороточной. В некоторых вариантах осуществления, среды, как в первом размножении, так и во втором, являются бессывороточными. В одном из вариантов осуществления, увеличение количества ТП использует не более одного типа среды для культивирования клеток. Можно использовать любую пригодную для использования среду для культивирования клеток, *например*, среду для культивирования клеток AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ стрептомицина сульфата и 10 мкМ гентамицина сульфата), среду для культивирования клеток (Invitrogen, Carlsbad CA). В этом отношении, способы по настоящему изобретению преимущественно уменьшают количество среды и количество типов сред, необходимых для размножения количества ТП. В одном из вариантов осуществления, увеличение количества ТП может включать фидинг клеток не чаще каждого третьего или четвертого дня. Увеличение количества клеток в газопроницаемом контейнере упрощают процедуры необходимые для размножения количества клеток посредством уменьшения частоты фидинга, необходимой для размножения клетки.

[0556] В одном из вариантов осуществления, среды для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере являются нефилтрованными. Использование нефилтрованной среды для культивирования клеток может упростить процедуры необходимые для размножения количества клеток. В одном из вариантов осуществления, в среде для культивирования клеток в первом и/или втором газопроницаемом контейнере отсутствует бета-меркаптоэтанол (BME).

[0557] В одном из вариантов осуществления, продолжительность способа, включающего получение образца ткани опухоли от млекопитающего; культивирование образца ткани опухоли в первом газопроницаемом контейнере, содержащем в себе среду для культивирования клеток; получение ТП из образца ткани опухоли; увеличение количества ТП во втором газопроницаемом контейнере, содержащем среду для культивирования клеток, включает продолжительность примерно 7-14 дней, *например*, примерно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления пред-REP составляет примерно 7-14 дней, *например*, примерно 11 дней. В некоторых вариантах осуществления, REP составляет примерно 7-14 дней, *например*, примерно 11 дней.

[0558] В одном из вариантов осуществления, ТП размножаются в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры используются для размножения ТП, используя РВМС, используя способы, композиции и устройства, известные в данной области, включая описанные в публикации заявки на патент США № 2005/0106717 A1, описание которого включается в настоящий документ в качестве ссылки. В одном из вариантов осуществления, ТП размножаются в газопроницаемых мешках. В одном из вариантов

осуществления, TIL размножаются, используя системы для размножения клеток, которые размножают TIL в газопроницаемых мешках, таких как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления, TIL размножаются, используя системы для размножения клеток, которые размножают TIL в газопроницаемых мешках, таких как WAVE Bioreactor System, также известная как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). В одном из вариантов осуществления, система для размножения клеток содержит газопроницаемый мешок для культивирования клеток с объемом, выбранным 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.

[0559] В одном из вариантов осуществления, TIL могут размножаться в колбах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты осуществления делают возможным размножение популяций клеток примерно от 5×10^5 клеток/см² до 10×10^6 - 30×10^6 клеток/см². В одном из вариантов осуществления это осуществляется без фидинга. В одном из вариантов осуществления, это осуществляется без фидинга, пока среда остается на высоте примерно 10 см в колбе G-Rex. В одном из вариантов осуществления это осуществляется без фидинга, но с добавлением одного или нескольких цитокинов. В одном из вариантов осуществления, цитокин может добавляться как болюс без какой-либо необходимости в смешивании цитокина со средой. такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области и используются для размножения TIL, и включают описанные в публикации заявки на патент США № US 2014/0377739 A1, в Международной публикации № WO 2014/210036 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0115617 A1, в Международной публикации № WO 2013/188427 A1, в публикации заявки на патент США № US 2011/0136228 A1, в патенте США № 8809050 B2, в Международной публикации № WO 2011/072088 A2, в публикации заявки на патент США № US 2016/0208216 A1, в публикации заявки на патент США № US 2012/0244133 A1, в Международной публикации № WO 2012/129201 A1, публикации заявки на патент США № US 2013/0102075 A1, в патенте США № 8956860 B2, в Международной публикации № WO 2013/173835 A1, в публикации заявки на патент США № US 2015/0175966 A1, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. Такие способы также описываются в Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, 2012, 35:283-292.

D. Необязательное криоконсервирование TIL

[0560] Либо объемная популяция TIL, либо размноженная популяция TIL может необязательно, криоконсервироваться. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирование осуществляется на терапевтической популяции TIL. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирование осуществляется на TIL, собранных после второго размножения. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирование осуществляется на TIL на иллюстративной Стадии F Фигуры 9. В некоторых вариантах осуществления, TIL криоконсервируются в инфузионном мешке. В некоторых вариантах

осуществления, ТП криоконсервируются перед помещением в инфузионный мешок. В некоторых вариантах осуществления, ТП криоконсервируются и не помещаются в инфузионный мешок. В некоторых вариантах осуществления, криоконсервирование осуществляется с использованием среды для криоконсервирования. В некоторых вариантах осуществления, среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (DMSO). Это, как правило, осуществляется посредством помещения популяции ТП в раствор для замораживания, например, 85% комплемент-деактивированной сыворотки АВ и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C , с необязательным переносом в морозилки с газообразным азотом для криоконсервирования. См. Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986.

[0561] При необходимости, клетки удаляют из морозилки и оттаивают на водяной бане при 37°C пока не оттаит приблизительно 4/5 раствора. Клетки, как правило, повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или несколько раз. В некоторых вариантах осуществления, оттаявшие ТП можно считать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области.

[0562] В предпочтительном варианте осуществления, популяция ТП криоконсервируется, используя среды для криоконсервирования CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). В предпочтительном варианте осуществления, популяция ТП криоконсервируется, используя среды для криоконсервирования, содержащие диметилсульфоксид (DMSO). В предпочтительном варианте осуществления, популяция ТП криоконсервируется, используя отношение 1:1 (объем:объем) CS10 и среды для культивирования клеток. В предпочтительном варианте осуществления, популяция ТП криоконсервируется, используя отношения примерно 1:1 (объем:объем) CS10 и среды для культивирования клеток, дополнительно содержащих дополнительный IL-2.

[0563] Согласно конкретным вариантам осуществления, композиция для криоконсервирования (также упоминаемая в настоящем документе как “среда для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида”) содержит популяцию ТП, полученную согласно настоящему изобретению (например, в количестве от 1×10^6 до 9×10^{13}), криопротекторную среду, содержащую DMSO, которая пригодна для консервирования клеток в низкотемпературных окружающих средах, например, при -70°C - -196°C (например, CryoStor® CS10), и раствор электролита (например, изотонический раствор, такой как PlasmaLyte® A). В предпочтительном варианте осуществления, криопротекторная среда и раствор электролита присутствуют при отношении в пределах примерно между 1,2:1 и примерно 1:1,2, или примерно между 1,1:1 и примерно 1:1,1 или, предпочтительно, составляет примерно 1:1. Согласно одному из вариантов осуществления, раствор электролита содержит одно или несколько соединений из ацетата, хлорида и глюконата натрия, калия, магния или их сочетание; например, раствор электролита может содержать хлорид натрия, глюконат натрия, натрий ацетат тригидрат, хлорид калия и хлорид магния. Согласно одному из вариантов осуществления, раствор электролита имеет

pH в пределах примерно между 7 и примерно 8, предпочтительно, примерно между 7,2 и примерно 7,6, или составляет примерно 7,4. Предпочтительно, композиция для криоконсервирования дополнительно содержит один или несколько стабилизаторов (например, сывороточный альбумин человека) и/или один или несколько факторов роста лимфоцитов (например, IL-2). Например, каждый препарат из криопротекторной среды и раствора электролита может присутствовать в композиции для криоконсервирования в количестве примерно от 20 мл примерно до 100 мл или примерно от 30 мл примерно до 70 мл, или примерно от 40 мл примерно до 60 мл, или составляет примерно 50 мл; сывороточный альбумин человека может присутствовать в количестве примерно от 0,01 г примерно до 2,0 г, или примерно от 0,1 г примерно до 1,0 г, или составляет примерно 0,5 г; и IL-2 может присутствовать в количестве примерно от 0,001 примерно до 0,005 мг, или примерно от 0,0015 мг примерно до 0,0025 мг, или он составляет примерно 0,0018 мг. Среда для криоконсервирования может необязательно содержать одну или несколько дополнительных добавок или наполнителей, таких как регуляторы pH, консерванты, и тому подобное.

[0564] Согласно одному из вариантов осуществления, композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ТП, имеет следующую композицию:

Номинальная композиция (% объем/объем) лекарственного продукта (на 100 мл)

Ингредиент	Номинальное количество на 100 мл наполнения	Функция
Инфильтрующие опухоль лимфоциты	83×10^7 - $3,0 \times 10^{10}$	Активный ингредиент
CryoStor [®] CS10 ^a	50 мл	Среда для криоконсервирования
PlasmaLyte A	50 мл	Изотонический агент
Сывороточный альбумин человека (HSA)	0,5 г	Стабилизатор
Интерлейкин-2	0,0018 мг (30000 IU)	Фактор роста лимфоцитов
Всего	100 мл	

^a Cryostor CS10 содержит 10% диметилсульфоксида (DMSO)

[0565] Как обсуждается выше на Стадиях А-Е, криоконсервирование может осуществляться во множестве точек в ходе способа размножения ТП. В некоторых вариантах осуществления, объемная популяция ТП после первого размножения согласно Стадии В или размноженная популяция ТП после одного или нескольких вторых размножений согласно Стадии D, может криоконсервироваться. Криоконсервирование, как правило, может осуществляться посредством помещения популяции ТП в раствор для замораживания, *например*, из 85% комплемент-деактивированной сыворотки АВ и 15% диметилсульфоксида (DMSO). Клетки в растворе помещают в криогенные флаконы и хранят в течение 24 часов при -80°C, с необязательным переносом в морозилки с газообразным азотом для криоконсервирования. Смотри Sadeghi, *et al.*, *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986.

[0566] При необходимости, клетки удаляются из морозилки и оттаиваются на

водяной бане при 37°C до тех пор, пока не оттает приблизительно 4/5 раствора. Клетки, как правило, повторно суспендируют в полной среде и необязательно промывают один или несколько раз. В некоторых вариантах осуществления, оттаявшие ТПЛ можно считать и оценивать на жизнеспособность, как известно в данной области.

[0567] В некоторых случаях, популяция ТПЛ со Стадии В может криоконсервироваться немедленно, используя протоколы, обсуждаемые ниже. Альтернативно, объемная популяция ТПЛ может подвергаться Стадии С и Стадии D, а затем криоконсервироваться после Стадии D. Подобным же образом, в случаях, когда генетически модифицированные ТПЛ будут использоваться в терапии, популяции ТПЛ со Стадии В или Стадии D могут подвергаться генетическим модификациям для соответствующего лечения.

V. Способы лечения раковых и других заболеваний

[0568] Композиции и способы, описанные в настоящем документе, можно использовать в способе лечения заболеваний. В одном из вариантов осуществления, они предназначены для использования при лечении гиперпролиферативных расстройств. Их можно также использовать при лечении других расстройств, как описано в настоящем документе и в следующих далее разделах.

[0569] В некоторых вариантах осуществления, гиперпролиферативное расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления, гиперпролиферативное расстройство представляет собой твердую раковую опухоль. В некоторых вариантах осуществления, твердая раковая опухоль выбирается из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая карциному сквамозных клеток головы и шеи (HNSCC)), рака почек и почечноклеточного рака. В некоторых вариантах осуществления, гиперпролиферативное расстройство представляет собой гематологическое злокачественное новообразование. В некоторых вариантах осуществления, твердая раковая опухоль выбирается из группы, состоящей из хронического лимфолейкоза, острого лимфоцитарного лейкоза, лимфомы больших В-клеток, лимфомы не-Ходжкина, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы и лимфомы мантийных клеток.

[0570] В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение включает способ лечения рака с помощью популяции ТПЛ, где пациент предварительно лечится с помощью немиелоаблативной химиотерапии до инфузии ТПЛ по настоящему описанию. В одном из вариантов осуществления, немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид, 60 мг/кг/день в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией ТПЛ), и флударабин, 25 мг/м²/день, в течение 5 дней (дни 27-23 перед инфузией ТПЛ). В одном из вариантов осуществления, после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии ТПЛ (в день 0) по настоящему изобретению, пациент принимает внутривенную инфузию IL-2, 720000 ME/кг каждые 8 часов, до появления физиологической толерантности.

[0571] Эффективность ТПЛ, описанных в настоящем документе, при лечении,

предотвращении и/или ведении указанных заболеваний или расстройств, можно исследовать используя различные модели известные в данной области, которые дают инструкцию для лечения заболевания человека. Например, модели для определения эффективности лечения рака яичников 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 лечения рака поджелудочной железы описаны в Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* 2012, 18, 1286-1294. Модели для определения эффективности лечения рака молочной железы описаны, *например*, в Fantozzi, *Breast Cancer Res.* 2006, 8, 212. Модели для определения эффективности лечения меланомы описаны, *например*, в Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* 2010, 23, 853–859. Модели для определения эффективности лечения рака легких описаны, *например*, в Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, 2005, 19, 643-664. Модели для определения эффективности лечения рака легких описаны, *например*, в Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* 2009, 2, 55-60; и Sano, *Head Neck Oncol.* 2009, 1, 32.

[0572] В некоторых вариантах осуществления, IFN-гамма (IFN- γ) является показателем эффективности лечения для лечения гиперпролиферативного расстройства. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ в крови субъектов, которых лечат ТП, является показателем активных ТП. В некоторых вариантах осуществления, используют анализ сильнодействия для продуцирования IFN- γ . Продуцирование IFN- γ представляет собой другую меру цитотоксичного потенциала. Продуцирование IFN- γ можно измерить посредством определения уровней цитокина IFN- γ в крови субъекта, которого лечат ТП, приготовленным согласно способам по настоящему изобретению, включая описанные, например, на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, ТП полученные с помощью способа по настоящему изобретению, обеспечивают повышение уровней IFN- γ в крови субъектов, которых лечат ТП способом по настоящему изобретению по сравнению с субъектами, которых лечат ТП, приготовленные используя способы, упоминаемые как процесс 1С, как иллюстрируется на Фигуре 13. В некоторых вариантах осуществления, повышение уровня IFN- γ является показателем эффективности лечения пациента, которого лечат ТП, полученными с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- γ повышается однократно, двукратно, трехкратно, четырехкратно или пятикратно, или более, по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, секреция IFN- γ повышается однократно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, секреция IFN- γ повышается двукратно по сравнению с нелеченым

пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы, иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, секреция IFN- γ повышается трехкратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, секреция IFN- γ повышается четырехкратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, секреция IFN- γ повышается пятикратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ измеряют, используя набор Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ измеряют, используя набор Quantikine ELISA. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ измеряют в ТП *ex vivo* от пациента, которого лечат ТП, полученными с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ измеряют в крови пациента, которого лечат ТП, полученными с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, IFN- γ измеряют в сыворотке пациента, которого лечат ТП, полученными с помощью способов по настоящему изобретению.

[0573] В некоторых вариантах осуществления, ТП полученные с помощью способов по настоящему изобретению, включая описанные, например, на Фигуре 20 или на Фигуре 21, демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с ТП, полученными другими способами, включая те, которые не иллюстрируются на Фигуре 20 или на Фигуре 21, такие, например, как способы упоминаемые как способы процесса 1С. В некоторых вариантах осуществления, значительно улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности лечения рака. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, увеличение поликлональности может представлять собой показатель эффективности лечения относительно введения ТП, полученных с помощью способов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает однократно, двукратно, десятикратно, 100-кратно, 500-кратно или 1000-кратно по сравнению с ТП, полученными, используя способы иные, чем предлагаются в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 20 или на Фигуре 21. В некоторых вариантах осуществления,

поликлональность возрастает однократно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает двукратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает десятикратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает 100-кратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает 500-кратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9. В некоторых вариантах осуществления, поликлональность возрастает 1000-кратно по сравнению с нелеченым пациентом и/или по сравнению с пациентом, которого лечат ТП, полученными, используя способы иные, чем способы, предлагаемые в настоящем документе, включая, например, способы иные, чем способы, которые воплощаются на Фигуре 9.

1. Способы совместного введения

[0574] В некоторых вариантах осуществления, ТП полученные, как описано в настоящем документе, включая, например ТП полученные из способа, описанного на Фигуре 20 или на Фигуре 21, можно вводить в сочетании с одним или несколькими регуляторами иммунных контрольных точек, таких как антитела, описанные ниже. Например, антитела, которые нацелены на PD-1 и которые могут вводиться совместно с ТП по настоящему изобретению, включают, *например*, но, не ограничиваясь этим, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; Opdivo®), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; Keytruda®), гуманизированное антитело анти-PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное антитело анти-PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (анти-PD-1 mAb CT-011, Medivation), моноклональное антитело анти-PD-1 BGB-A317 (BeiGene) и/или антитело анти-PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклональное антитело REGN2810 человека (Regeneron), моноклональное антитело MDX-1106 человека (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизированное антитело анти-PD-1 IgG4 PDR001 (Novartis). В некоторых вариантах осуществления, антитело анти-PD-1 происходит из клона: RMP1-14 (IgG крысы) - BioXcell cat# BP0146. Другие соответствующие антитела пригодные для

использования в способах совместного введения с TIL, полученными согласно Стадиям A-F, как описано в настоящем документе, представляют собой антитела анти-PD-1, описанные в патенте США № 8008449, включенном в настоящий документ в качестве ссылки. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть специфично связывает PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, тем самым увеличивая иммунную активность. Любые антитела, известные в данной области, которые связывают PD-L1 и разрушают взаимодействие между PD-1 и PD-L1, и стимулируют антиопухолевую иммунную реакцию, являются пригодными для использования в способах совместного введения с TIL, полученными согласно Стадиям A-F, как описано в настоящем документе. Например, антитела, которые нацелены на PD-L1 и находятся на клинических исследованиях, включают BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие пригодные для использования антитела, которые нацелены на PD-L1, описываются в патенте США № 7943743, включенном в настоящий документ в качестве ссылки. Специалисту в данной области будет понятно, что любое антитело, которое связывает PD-1 или PD-L1, разрушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевую иммунную реакцию, является пригодным для использования в способах совместного введения с TIL, полученными согласно Стадиям A-F, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, субъект, которому вводят сочетание TIL, полученное согласно Стадиям A-F, получает также совместное введение антитела анти-PD-1, когда пациент имеет тип рака, который является стойким к введению одного только антитела анти-PD-1. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят TIL в сочетании с анти-PD-1, когда пациент имеет стойкую меланому. В некоторых вариантах осуществления, пациенту вводят TIL в сочетании с анти-PD-1, когда пациент имеет немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

2. Необязательное лимфодеплеционное предварительное кондиционирование пациентов

[0575] В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение включает способ лечения рака популяцией TIL, где пациента предварительно лечат с помощью немиелоаблативной химиотерапии перед инфузией TIL по настоящему описанию. В одном из вариантов осуществления, настоящее изобретение включает популяцию TIL для использования при лечении рака у пациента, которого предварительно лечат с помощью немиелоаблативной химиотерапии. В одном из вариантов осуществления, популяция TIL предназначена для введения посредством инфузии. В одном из вариантов осуществления, немиелоаблативная химиотерапия представляет собой циклофосфамид, 60 мг/кг/день в течение 2 дней (дни 27 и 26 перед инфузией TIL) и флударабин, 25 мг/м²/день в течение 5 дней (дни 27-23 перед инфузией TIL). В одном из вариантов осуществления, после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (в день 0) по настоящему описанию, пациент принимает внутривенную инфузию IL-2 (альдеслейкина, коммерчески доступного как PROLEUKIN) внутривенно при 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до появления физиологической толерантности. В определенных вариантах осуществления, популяция

ТП предназначена для использования при лечении рака в сочетании с П-2, где П-2 вводится после популяции ТП.

[0576] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоли-специфичных Т лимфоцитов играет ключевую роль в усилении эффективности лечения посредством удаления регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы ('стоков цитокинов'). Соответственно, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения используют стадию лимфодеплеции (иногда также упоминаемую как "иммуносупрессорное кондиционирование") для пациента до введения ТП по настоящему изобретению.

[0577] Как правило, лимфодеплеция достигается, используя введение флударабина или циклофосфамида (активная форма, упоминаемая как мафосфамид) и его 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 они включаются в настоящий документ в качестве ссылок во всей своей полноте.

[0578] В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводится при концентрации флударабина от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводится при концентрации флударабина 1 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления, лечение флударабином вводится в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводится при дозе 10 мг/кг/день, 15 мг/кг/день, 20 мг/кг/день, 25 мг/кг/день, 30 мг/кг/день, 35 мг/кг/день, 40 мг/кг/день или 45 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления, лечение флударабином вводится в течение 2-7 дней при дозе 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления, лечение флударабином вводится в течение 4-5 дней при дозе 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления, лечение флударабином вводится в течение 4-5 дней при дозе 25 мг/кг/день.

[0579] В некоторых вариантах осуществления, мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают при концентрации от 0,5 мкг/мл до 10 мкг/мл посредством введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают при концентрации 1 мкг/мл посредством введения циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, лечение циклофосфамидом вводится в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней или больше. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводится при дозе 100 мг/м²/день, 150 мг/м²/день, 175 мг/м²/день, 200 мг/м²/день, 225 мг/м²/день, 250 мг/м²/день, 275 мг/м²/день или 300 мг/м²/день. В некоторых вариантах осуществления, циклофосфамид вводится внутривенно (*то есть*, i.v.) В некоторых вариантах осуществления, лечение циклофосфамидом вводится в течение 2-7 дней при 35 мг/кг/день. В некоторых вариантах осуществления, лечение циклофосфамидом вводится в течение 4-5 дней при 250 мг/м²/день i.v. В некоторых вариантах осуществления, лечение циклофосфамидом вводится в течение 4 дней при 250 мг/м²/день i.v.

[0580] В некоторых вариантах осуществления, лимфодеплегция осуществляется посредством введения пациенту вместе флударабина и циклофосфамида. В некоторых вариантах осуществления, флударабин вводится при дозе 25 мг/м²/день i.v. и циклофосфамид вводится при дозе 250 мг/м²/день i.v. в течение 4 дней.

[0581] В одном из вариантов осуществления, лимфодеплегция осуществляется посредством введения циклофосфамида при дозе 60 мг/м²/день в течение двух дней с последующим введением флударабина при дозе 25 мг/м²/день в течение пяти дней.

3. Режимы введения IL-2

[0582] В одном из вариантов осуществления, режим введения IL-2 включает режим высоких доз IL-2, где режим высоких доз IL-2 содержит альдеслейкин или его биологически подобные соединения или вариант, вводимый внутривенно, начиная со дня после введения терапевтически эффективной части терапевтической популяции ТIL, где альдеслейкин или его биологически подобное соединение или вариант вводится при дозе 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (массы тела пациента) используя 15-минутные внутривенные инфузии болюса каждые восемь часов, пока не возникнет толерантность, в течение максимум 14 дозирования. После 9 дней отдыха, этот временной график может повторяться еще для 14 доз, максимум для 28 доз в целом.

[0583] В одном из вариантов осуществления, режим введения IL-2 включает режим введения IL-2 с уменьшением доз. Режимы введения IL-2 с уменьшением доз описаны в O'Day, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 1999, 17, 2752-61 и Eton, *et al.*, *Cancer* 2000, 88, 1703-9, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок. В одном из вариантов осуществления, режим введения IL-2 с уменьшением доз включает внутривенное введение 18×10^6 МЕ/м² в течение 6 часов, затем внутривенное введение 18×10^6 МЕ/м² в течение 12 часов, затем внутривенное введение 18×10^6 МЕ/м² в течение 24 часов, затем внутривенное введение $4,5 \times 10^6$ МЕ/м² в течение 72 часов. Этот режим лечения может повторяться каждые 28 дней в течение максимум четырех циклов. В одном из вариантов осуществления, режим введения IL-2 с уменьшением доз включает 18000000 МЕ/м² в День 1 19000000 МЕ/м² в День 2 и 4500000 МЕ/м² в дни 3 и 4.

[0584] В одном из вариантов осуществления, режим введения IL-2 включает введение пегилированного IL-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 или 21 день при дозе 0,10 мг/день - 50 мг/день.

4. Адоптивный перенос клеток

[0585] Адоптивный перенос клеток (АСТ) представляет собой очень эффективную форму иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток с противоопухолевой активностью пациентам с раковыми заболеваниями. АСТ представляет собой подход к лечению, который включает идентификацию *in vitro* лимфоцитов с противоопухолевой активностью, размножение *in vitro* этих клеток до больших количеств и их инфузию хозяину, имеющему рак. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, можно получить из стромы иссеченных опухолей (инфильтрующие опухоль лимфоциты или ТIL). ТIL для АСТ можно получить, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах

осуществления, ТП получают, например, согласно способу, как описано на Фигуре 9. Их также можно получить из крови, если их получают с помощью генной инженерии для экспрессирования противоопухолевых рецепторов Т-клеток (TCR) или химерных рецепторов антигенов (CAR), они обогащены смешанными культурами лимфоцитов и клеток опухоли (MLTC), или они клонируются, используя аутологичные антиген-презентирующие клетки и пептиды, полученные из опухоли. АСТ, в которых лимфоциты происходят от хозяина, имеющего рак, которому необходима инфузия, называют аутологичными АСТ. Публикация США № 2011/0052530 относится к способу осуществления адоптивной клеточной терапии для облегчения регрессии рака, прежде всего, для лечения пациентов, страдающих метастатической меланомой, она включается в качестве ссылки во всей своей полноте относительно этих способов. В некоторых вариантах осуществления, ТП могут вводиться, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, ТП могут вводиться в одной дозе. Такое введение может осуществляться посредством инъекции, *например*, внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления, ТП и/или цитотоксичные лимфоциты могут вводиться во множестве доз. Дозирование может осуществляться один раз, два, три раз, четыре раза, пять раз, шесть раз или более шести раз в год. Дозирование может осуществляться раз в месяц, раз в две недели, раз в неделю или через день. Введение ТП и/или цитотоксичных лимфоцитов может продолжаться настолько долго, насколько это необходимо.

ПРИМЕРЫ

[0586] Варианты осуществления, охваченные в настоящем документе, описываются теперь со ссылками на следующие далее примеры. Эти примеры приводятся только для целей иллюстрации, и описание, охватываемое в настоящем документе не должно ни в коем случае рассматриваться как ограниченное этими примерами, но скорее должно рассматриваться как охватывающее любые и все варианты, которые становятся очевидными как результат концепции, предлагаемой в настоящем документе.

ПРИМЕР 1. ПРОДУЦИРОВАНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ТП.

[0587] Этот пример описывает получение терапии ТП с помощью cGMP в колбах G-Rex согласно современным Good Tissue Practices и современным Good Manufacturing Practices.

План процесса эталонного размножения

Оцениваемый день (после высева)	Вид активности	Целевые критерии	Предполагаемые емкости	Оцениваемый общий объем (мл)
0	Расщепление опухоли	≤50 желаемых фрагментов опухоли на G-Rex100MCS	1 колба G-Rex100MCS	≤1000
11	Высевание REP	5-200×10 ⁶ жизнеспособных клеток на G-Rex500MCS	1 колба G-Rex500MCS	≤5000

16	Разделение REP	1×10^9 жизнеспособных клеток на G-Rex500MCS	≤ 5 колб G-Rex500MCS	≤ 25000
22	Сбор	Общее количество доступных клеток	3-4 мешка CS-750	≤ 530

Объемы колб:

Тип колбы	Рабочий объем/колб (мл)
G-Rex100MCS	1000
G-Rex500MCS	5000

ОБОРУДОВАНИЕ

[0588] Список оборудования: День 0, приготовление сред CM1/приготовление промывки для рассечения опухоли:

Датчик перепада давления Magnehelic
 Ламинарный бокс биологической защиты (BSC)
 Инкубатор
 Анализатор CO₂
 Пипеточный микродозатор (100-1000 мкл)
 Пипеточный дозатор
 Насос перистальтический REPEATER Ваха
 Запайватель магистралей Sebra
 Холодильник, 2-8°C
 Морозилка, -80°C
 Морозилка, -20°C
 Таймер

[0589] Список оборудования: приготовление CM2/День 11, высевание REP

Датчик перепада давления Magnehelic
 Ламинарный бокс биологической защиты (BSC)
 Инкубатор
 Инкубатор
 Анализатор CO₂
 Сухая баня
 Водяная баня
 Система оттаивания CytoTherm

Устройство для сварки
 Воздушный насос для манипуляций с жидкостями Gatherex
 Счетчик клеток Счетчик клеток NC200 NucleoCounter
 Насос перистальтический REPEATER Ваха
 Остаток запайвателя магистралей Sebra

[0590] Список оборудования: приготовление CM2/День 11, высевание REP

Центрифуга

Пипеточный микродозатор (100-1000 μ L)

Пипеточный дозатор

Таймер

Холодильник, 2-8°C

Морозилка, -80°C

Морозилка с контролируемой скоростью изменения температуры

Морозилка для хранения LN2 (Quarantine)

Морозилка, -20°C

[0591] Список оборудования: приготовление СМ4/День 16

Датчик перепада давления Magnehelic

Ламинарный бокс биологической защиты (BSC)

Инкубатор

Инкубатор

Анализатор CO₂

Устройство для сварки

Устройство для сварки

Gatherex

Счетчик клеток NC200 NucleoCounter

Насос перистальтический REPEATER Ваха

Остаток запаивателя магистралей Sebra

Пипеточный микродозатор (100-1000 мкл)

Пипеточный дозатор

Холодильник, 2-8°C

Морозилка, -80°C

[0592] Список оборудования: День 22, приготовление, заполнение, криоконсервирование

Датчик перепада давления Magnehelic

Ламинарный бокс биологической защиты (BSC)

Инкубатор

Инкубатор

Анализатор CO₂

Устройство для сварки

Gatherex

Счетчик клеток NC200 NucleoCounter

Насос перистальтический REPEATER Ваха

Остаток запаивателя магистралей Sebra

Пипеточный микродозатор (20-200 мкл), пипеточный дозатор

[0593] Список оборудования: День 22, приготовление, заполнение, криоконсервирование

Пипеточный дозатор

Холодильник, 2-8°C

Морозилка, -80°C

Морозилка с контролируемой скоростью изменения температуры

Морозилка для хранения LN₂

Морозилка для хранения LN₂ (Quarantine)

Система процессирования клеток LOVO

7.0 МАТЕРИАЛЫ

[0594] Материалы: День 0, приготовление сред CM1/приготовление промывки для опухоли/ Иссечение опухоли

[0595]

Одноразовые скальпели, 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, крышка на резьбе, PP, стерильная

25-мл Серологическая пипетка, стерильная

5-мл Серологическая пипетка, стерильная

Одноразовый фильтр для культур тканей, MF75 Series, 1000 мл, фильтр aPES, 0,2 мкм, стерильный

Серологические пипетки 100 мл

жидкий 2-меркаптоэтанол 1000X, 55 mM в D-PBS

Сбалансированный натриевый солевой раствор Хэнка (1X), жидкий, без хлорида кальция, хлорида магния, сульфата магния

Жидкий GlutaMAX 1-200 mM (100X)

Наконечники пипеток ART Barrier, 1000 мкл, в индивидуальной обертке, стерильные

150 мм Чашка Петри, самая глубокая, стерильная

6-луночные планшеты с ультранизким прикреплением клеток к поверхности, площадь лунок для роста 9,5 см², PS, стерильные

Пипетки для переноса общего назначения Thermo Scientific Samco, 7,7 мл, стерильные

Входящий элемент Луер-лока комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER

Длинные шипцы, 8 дюймов, стерильные

Гентамицин сульфат, 50 мг/мл, исходный раствор

Исследовательские одноразовые шипцы, 4,5 дюйма, нержавеющая сталь, стерильные

100 мм чашка Петри, стерильная самая глубокая

Система для распределения жидкости Pumpmatic

Гентамицин сульфат, 50 мг/мл, исходный раствор

Колпачок для шприца с двойной функцией, красный
 RPMI-1640, 1-л бутылка
 Замкнутая система с колбой G-Rex 100M
 Стерильные линейки
 Разбавленный PL-2
 Образец опухоли человека, голова и шея ☐ Нет
 Образец опухоли человека, шейка матки ☐ Нет
 Сыворотка АВ человека GemCell, термически дезактивированная ☐ Нет • Образец
 опухоли человека, меланома
 сыворотка АВ человека GemCell, термически дезактивированная
 [0596] Материалы: приготовление CM2/День 11, высевание REP
 шприц с Луэр-локом, 60 мл, стерильная игла 16G × 1,5 дюйма, стерильный
 50-мл Серологические пипетки, стерильные
 1-мл Серологическая пластиковая пипетка, стерильная
 Флаконы с внутренней резьбой Cryotube, Nunc, стерильные
 10-мл Серологическая пипетка, стерильная
 Центрифужная пробирка, 15 мл
 Центрифужная пробирка, 50 мл
 Серологические пипетки 100 мл
 Шприц, 1 см³, стерильный Луэр-лок
 3-мл Шприц, Наконечник с Луэр-локом, стерильный
 5-мл Серологическая пипетка, стерильная
 Приемник фильтрующего элемента Nalgene *MF75* Series, 250 мл, стерильный •
 Приемник фильтрующего элемента Nalgene MF75 Series, 500 мл, стерильный
 1000-мл Стерильный одноразовый элемент фильтра Rapid-Flow Nalgene, PES 0,22
 мкм
 Среда CryoStor CS-10
 Жидкий 2-меркаптоэтанол 1000X, 55 mM в D-PBS
 Жидкий GlutaMAX 1-200 mM (100X),
 1000-мкл Стерильные наконечники пипеток ART Barrier, индивидуальная обертка
 Кассеты VIA1
 Транспортный упаковочный контейнер, 1000 мл с соединителем, стерильный
 Транспортная упаковка 300 мл с соединителем
 Стерильные тампоны со спиртом
 Входящие элементы Луэр-лока комплекта для переноса текучих сред с насосом
 REPEATER
 1-л бутылка CTS AIM V
 Чистое CD3 MACS GMP (ОКТ-3)
 Гентамицин сульфат, 50 мг/мл, исходный раствор
 4-дюймовая трубка с иглой для прокола и шприцевой адаптер

10-мл шприц, только Луэр-лок
 Трубка, четырехконечный входящий коллектор Луэра
 Набор для введения крови под действием силы тяжести Y-типа без узла для инъекций, 170-мкм фильтр для крови
 Система для распределения жидкости Pumpmatic
 10-л 3-входовой мешок Labtainer
 Гентамицин сульфат, 50 мг/мл, исходный раствор
 100-мл шприц
 3000-мл мешок для культивирования
 Распределительная система Cell Connect CC2 Origen
 Колпачок для шприца с двойной функцией, красный
 1-л бутылка RPMI-1640
 Замкнутая система с колбой G-Rex 500M
 Разбавленный IL-2
 Аллогенные облученные клетки-фидеры
 Аллогенные облученные клетки-фидеры
 сыворотка человека, тип АВ(Н1), Gemini
 сыворотка человека, типа АВ(Н1), Gemini
 [0597] Материалы: приготовление СМ4/День 16
 Шприц с Луэр-локом, 60 мл стерильный
 1-мл Серологическая пластиковая пипетка, стерильная
 Флаконы с внутренней резьбой Cyrotube, Nunc, стерильные
 10-мл Серологические пипетки, стерильные
 Центрифужная пробирка, 15 мл
 Центрифужная пробирка, 50 мл
 Серологические пипетки 100 мл
 Шприц с Луэр-локом, стерильный, 3 мл
 5-мл Серологическая пипетка, стерильная
 10-мл шприц только с Луэр-локом
 Nalgene *MF75* Series
 Приемник фильтрующего элемента, 250 мл, стерильный
 Жидкий GlutaMAX1-200 mM (100X),
 Наконечники пипеток ART Bactier, 1000 мкл, в индивидуальной обертке, стерильные
 VIA1 Кассеты
 [0598] Материалы: приготовление СМ4/День 16
 Транспортный упаковочный контейнер, 1000 мл с соединителем, стерильный
 Стерильные тампоны со спиртом
 Входящие элементы Луэр-лока комплекта для переноса текучих сред с насосом
 REPEATER
 CTS AIM-V, 1000 мл ☐ Нет

4-дюймовая трубка для комплекта для переноса плазмы с принимающим адаптером
Луэра

30-мл стерильный шприц Луэра

10-л мешок CTS AIM V

Система для распределения жидкости Pumpmatic

10-л 3-входный мешок Labtainer

Колпачок для шприца с двойной функцией, красный

Замкнутая система с колбой G-Rex500M

Разбавленный PL-2

[0599] Материалы: День 22, приготовление, заполнение, криоконсервирование

Шприц с Луэр-локом, 60 мл стерильный

Игла 16G × 1,5 дюйма, стерильная

50-мл Серологические пипетки, стерильные

Флаконы с внутренней резьбой Cryotubes Nunc, стерильные

10 мл Серологическая пипетка, стерильная

Центрифужная пробирка, 15 мл

Центрифужная пробирка, 50 мл

Шприц, 1-см³, стерильный, Луэр-лок

3-мл Шприц, наконечник с Луэр-локом, стерильный

25-мл Серологическая пипетка, стерильная

5 мл Серологическая пипетка, стерильная

10 мл шприц только с Луэр-локом

Серологические пипетки 100 мл

Стерильные наконечники пипеток ART Barrier, 200-мкл, индивидуальная обертка

VIA1-Кассеты

Plasma-Lyte A Injection 1 л

Одноразовый набор для промывания клеток LOVO

Набор вспомогательных мешков LOVO

Стерильные тампоны со спиртом

Входящие элементы Луэр-лока комплекта для переноса текучих сред с насосом

REPEATERS

1-л бутылка CTS AIM V

Альбумин человека, 25%

4-дюймовая трубка комплекта для переноса плазмы с принимающим адаптером

Луэра

Трубка, четырехконечной входящий коллектор Луэра

Введение крови под действием силы тяжести

Набор Y-типа без устройства для инъекций, 170-мкм фильтр для крови

Система для распределения жидкости Pumpmatic

10-л 3-входный мешок Labtainer

100-мл шприц

Cryo bag CS750

3-л Мешок для культивирования

Распределительная система Cell Connect CC2 Origen

Колпачок для шприца с двойной функцией, красный

100-мл Мешок Cryostor CS10

Распределительный штырек, вентилируемый

Разбавленный PL-2

[0600] ПРОЦЕСС

8.1 День 0, приготовление сред CM1

8.1.1 Проверка санитарной обработки помещения, очистки линии и материалов.

Подтверждение санитарной обработки помещения,

8.1.2 Проверка полного выполнения списка операций предварительного процессирования.

8.1.3 Мониторинг окружающей среды. Перед предварительным процессированием, убеждаются, что был начат мониторинг окружающей среды перед процессом.

8.1.4 Приготовление сред RPMI 1640 в BSC, используя пипетку соответствующего размера, удаляют 100,0 мл из 1000 мл среды RPMI 1640 и помещают в контейнер соответствующего размера, маркированный “Отходы”.

8.1.5 В BSC добавляют реагенты в бутылку со средой RPMI 1640. Добавляют следующие реагенты в бутылку со средой RPMI 1640, как показано в Таблице. Добавляют зарегистрированные объемы. Количество, добавляемое на одну бутылку: термически дезактивированная сыворотка АВ человека (100,0 мл); GlutaMax (10,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл); 2-меркаптоэтанол (1,0 мл)

8.1.6 Перемешивание среды. Закрывают крышкой бутылку со средой RPMI 1640 со стадии 8.1.5, и бутылку взбалтывают для обеспечения тщательного перемешивания реагентов.

8.1.7 Фильтрация среды RPMI. Среду RPMI 1640 со стадии 8.1.6 фильтруют через 1-л 0,22-микронный узел фильтра.

8.1.8 Маркировка фильтрованной среды. Асептически закрывают крышками отфильтрованные среды и маркируют их с помощью следующей далее информации.

8.1.9 Удаление ненужных материалов из BSC. Выводят реагенты среды из BSC, оставляют гентамицин сульфат и HBSS в BSC для приготовленного препарата промывочных сред в Секции 8.2.

8.1.10 Хранение неиспользуемых расходных материалов. Переносят любые оставшиеся открытые/оттаявшие реагенты сред в соответствующие условия для хранения или выбрасывают в отходы. Примечание: присваивают соответствующий открытый срок годности согласно Примечанию к процессу 5.9 и маркируют зарегистрированным номером партии загрузки

8.1.11 Оттаивание аликвоты IL-2. Оттаивают 1,1 мл аликвоту IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) пока весь лед не растает. Регистрируют IL-2: номер партии и срок годности (Примечание: убеждаются, что этикетка IL-2 прикреплена).

8.1.12 Перенос исходного раствора IL-2 в среду. В BSC переносят 1,0 мл исходного раствора IL-2 в бутылку для среды CM1, День 0, приготовленную на Стадии 8.1.8. Добавляют 1 бутылку для среды CM1, День 0, и IL-2 (6×10^6 МЕ/мл), 1,0 мл.

8.1.13 Повторное перемешивание и регистрация. Закрывают крышкой и взбалтывают бутылку для перемешивания среды, содержащей IL-2. Маркируют еще раз как “полная среда CM1, День 0” и присваивают новый номер партии.

8.1.14 Среды для отбора образцов согласно плану работы с образцами. Удаляют 20,0 мл среды, используя пипетки соответствующего размера, и распределяют в 50-мл коническую пробирку.

8.1.15 Маркировка и хранение. Образец маркируют с помощью маркировки согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят образец “хранение сред” при 2-8°C до подачи на Вход для исследования согласно плану работы с образцами.

8.1.16 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций работы с образцами LIMS выполнен, для удаления образца.

8.1.17 Приготовление конической пробирки “кусочки тканей”. В BSC переносят 25,0 мл “Полной среды, день 0” (приготовленной на Стадии 8.1.13) в 50-мл коническую пробирку. Маркируют пробирку как “кусочки тканей” и присваивают номер партии загрузки.

8.1.18 Перенос G-Rex100MCS в BSC. Асептически переносят G-Rex100MCS (W3013130) в BSC.

8.1.19 Приготовление G-Rex100MCS. В BSC, закрывают все зажимы на G-Rex100MCS, оставляя открытым зажим вентиляционного фильтра.

8.1.20 Приготовление G-Rex100MCS. Соединяют красную линию колбы G-Rex100MCS с краем с большим диаметром комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER (W3009497) с помощью соединения Луэр-лок.

8.1.21 Подготовка насоса Ваха. Устанавливают насос Ваха после BSC. Удаляют секцию трубы насоса комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER из BSC и устанавливают в насос REPEATER.

8.1.22 Подготовка сред для перекачки. В BSC, удаляют шприц из системы для распределения жидкости Pumpmatic (PLDS) (W3012720) и утилизируют. Примечание: убеждаются в том, что стерильность пипетки не пипетки PLDS не ослабляется.

8.1.23 Подготовка сред для перекачки. Соединяют пипетку PLDS с краем с меньшим диаметром комплекта для переноса текучих сред и с насосом REPEATER с помощью соединения Луэр-лок и помещают наконечник пипетки в “Полные среды, день 0” (приготовленные на Стадии 8.1.13) для отсоса. Открывают все зажимы между средой и G-Rex100MCS.

8.1.24 Закачка полной среды CM1 в колбу G-Rex100MCS. Устанавливают скорость насоса как “Высокая” и “9” и перекачивают все полные среды, день 0, в колбу G-Rex100MCS. После переноса всех сред, очищают линию и останавливают насос.

8.1.25 Отсоединение насоса от колбы. Убеждаются, что все зажимы на колбе закрыты, за исключением вентиляционного фильтра. Удаляют установку для переноса текучих сред с насосом REPEATER из красной линии для сред, и помещают красный колпачок (W3012845) на красную линию для среды.

8.1.26 Термическая герметизация. Удаляют колбу G-Rex100MCS из BSC, нагревают уплотнение (согласно Примечанию к процессу 5.12), термически убирают красный колпачок с красной линии рядом с конечным соединением Луэра.

8.1.27 Маркировка G-Rex100MCS. Маркируют колбу G-Rex100MCS меткой “День 0”, полученной в ходе процесса QA (исследования). Прикрепляют метку образца “День 0” ниже.

8.1.28 Мониторинг инкубатора. Параметры инкубатора: Температура LED дисплея: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$; процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂

8.1.29 Нагревание среды. Помещают 50-мл коническую пробирку, маркированную “Фрагменты ткани”, приготовленную на Стадии 8.1.17, и G-Rex100MCS, приготовленную на Стадии 8.1.27, в инкубатор для нагрева ≥ 30 минут. Регистрируют времена нагрева ниже. Регистрируют, если время нагрева ≥ 30 минут (Да/Нет).

[Фрагменты тканей в конической пробирке или GRex100MCS]

8.1.30 Обзор секции 8.1.

8.2 День 0, приготовление среды для промывки опухоли

8.2.1 Добавление гентамицина к HBSS. В BSC, добавляют 5,0 мл гентамицина (W3009832 или W3012735) в 1×500 мл бутылку со средой HBSS (W3013128). Регистрируют объемы, добавляемые в одну бутылку: HBSS (500,0 мл); гентамицин сульфат, 50 мг/мл (5,0 мл)

8.2.2 Закрывание бутылки HBSS крышкой и взбалтывание. Закрывают крышкой бутылку, содержащую HBSS и гентамицин, приготовленную на Стадии 8.2.1, и бутылку взбалтывают для обеспечения тщательного перемешивания реагентов.

8.2.3 Фильтрация раствора. HBSS, содержащий гентамицин, приготовленный на Стадии 8.2.1, фильтруют через 1-л узел 0,22-микронного фильтра (W1218810).

8.2.4 Асептическое закрывание крышкой и регистрация фильтрованной среды. Асептически закрывают крышкой фильтрованную среду и маркируют ее с помощью следующей далее информации. Переходят к секции 8.3.

8.2.5 Обзор секции 8.2.

8.3 День 0, процессирование опухоли

8.3.1 Получение опухоли. Получают образец опухоли от QAR (внешней оценки качества) и переносят в помещение при $2-8^{\circ}\text{C}$ непосредственно для процессирования. Убеждаются что вся необходимая информация зарегистрирована в регистрационной записи для транспортировки загрузки опухоли.

8.3.2 Регистрация информации об опухоли.

8.3.3 Фиксирование регистрации опухоли. Прикрепление фиксированного маркировки опухоли. Выходной стикер QAR ниже. Прикрепление регистрационной записи транспортировки загрузки опухоли как № 5.

8.3.4 Перенос материалов, необходимых для иссечения опухоли, в BSC.

8.3.5 Открывание материалов. Открывают все материалы внутри BSC, убеждаясь, что это не ослабляет стерильность объектов.

8.3.6 Маркированные материалы. Маркируют три 50-мл конических пробирки: первую как “щипцы”, вторую как “скальпель” и третью как “среда для промывки свежей опухоли”. Маркируют 5 × 100 мм чашек Петри как “промывка 1”, “промывка 2”, “промывка 3”, “удерживание” и “неблагоприятные”. Маркируют один 6 луночный планшет как “Благоприятные промежуточные фрагменты”.

8.3.7 Аликвотирование среды для промывки опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 5,0 мл “среды для промывки опухоли” приготовленной на Стадии 8.2.4, в каждую лунку одного 6-луночного планшета для благоприятных промежуточных фрагментов опухоли (всего 30,0 мл). Примечание: при необходимости щипцы и скальпели хранятся в соответствующих своих конических пробирках для среды для промывки опухоли в ходе процессов промывки и рассечения опухоли. 8.3.8 Аликвотирование среды для промывки опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 50,0 мл “среды для промывки опухоли” приготовленной на Стадии 8.2.4, в каждую из 100-мм чашек Петри, маркированных как “промывка 1,” “промывка 2,” “промывка 3” и “удерживание” (всего 200,0 мл).

8.3.9 Аликвотирование среды для промывки опухоли. Используя пипетку соответствующего размера, переносят 20,0 мл «среды для промывки опухоли», приготовленной на Стадии 8.2.4, в каждую 50-мл коническую пробирку (всего 60,0 мл).

8.3.10 Приготовление крышек для кусочков опухоли. Асептически удаляют крышки с двух 6-луночных планшетов. Крышки используют для выбранных кусочков опухоли. Примечание: в ходе процессирования опухоли, не пересекают поверху открытые планшеты для культивирования тканей и крышки.

8.3.11 Перенос опухоли в BSC. Асептически переносят опухоль в BSC. Регистрируют время начала процессирования.

8.3.12 Промывка опухоли 1. Используя 8-дюймовые щипцы (W3009771), опухоли удаляют из бутылки для образцов и переносят в чашку “промывка 1”, приготовленную на Стадии 8.3.8. Примечание: сохраняют раствор в бутылке для образцов.

8.3.13 Промывка опухоли 1. Используя щипцы, осторожно промывают опухоль согласно таймеру, ниже: промывают образец и оставляют его в покое в течение ≥ 3 минут. Регистрируют время промывки (мин:сек).

8.3.14 Приготовление образца биологической нагрузки согласно плану работы с образцами. Переносят 20,0 мл (или доступный объем) раствора из бутылки с образцом опухоли в 50-мл конические пробирки согласно плану работы с образцами.

8.3.15 Маркировка и хранение образца. Маркируют образец с помощью маркировки согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят образец биологической нагрузки, собранный на Стадии 8.3.14, при 2-8°C до поступления на исследование.

8.3.16 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список LIMS согласно плану работы с образцами завершен, для удаления образца.

8.3.17 Промывка опухоли 2. Используя новый набор щипцов, удаляют опухоль из чашки “промывка 1” и переносят в чашку “промывка 2”, приготовленную на Стадии 8.3.8.

8.3.18 Промывка опухоли 2. Используя щипцы, промывают образец опухоли посредством осторожного перемешивания в течение ≥ 3 минут и оставляют его в покое. Регистрируют время.

8.3.19 Приготовление капель среды для промывки опухоли для желаемых кусочков опухоли. Используя пипетку для переноса, помещают 4 индивидуальных капли среды для промывки опухоли из конических пробирок, приготовленных на Стадии 8.3.9, на каждый из 6 кружков на перевернутых крышках 6-луночных планшетов (2 крышки). Помещают дополнительную каплю на двух кружках, до 50 капель в целом.

8.3.20 Промывка опухоли 3. Используя щипцы, удаляют опухоль из чашки “промывка 2” и переносят в чашку “промывка 3”, приготовленную на Стадии 8.3.8.

8.3.21 Промывка опухоли 3. Используя щипцы, промывают образец опухоли посредством осторожного перемешивания и оставляют его в покое в течение ≥ 3 минут. Регистрируют время.

8.3.22 Приготовление чашки для рассечения опухоли. Помещают линейку под 150-мм крышку чашки.

8.3.23 Перенос опухоли в чашку для рассечения. Используя щипцы, асептически переносят образец опухоли в 150-мм крышку чашки для рассечения.

8.3.24 Измерение опухоли. Размещают все куски образца опухоли от края до края и регистрируют примерную общую длину и количество фрагментов. Получают четкую картинку для каждого образца опухоли.

8.3.25 Оценка опухоли. Опухоль оценивают на некротическую/жировую ткань. Оценивают, являются ли $>30\%$ от всей наблюдаемой области опухоли некротической и/или жировой тканью; если да, выбранная область контакта для получения опухоли имеет соответствующий размер, тогда ее переходят на Стадию 8.3.26. Оценивают, являются ли $<30\%$ от всей области опухоли, которую наблюдают, некротической или жировой тканью; если да, переходят на Стадию 8.3.27 и рассечения для очистки не осуществляют.

8.3.26 Если это применимо: рассечение для очистки. Если опухоль большая и $>30\%$ наблюдаемой ткани, согласно наблюдениям, являются некротическими/жировыми, осуществляют “рассечение для очистки” посредством удаления некротической/жировой ткани, сохраняя при этом внутреннюю структуру опухоли, с использованием сочетания скальпеля и/или щипцов. Примечание: для сохранения внутренней структуры опухоли, используют только вертикальное давление резания. Не режут с помощью пилящего

движения скальпеля. Примечание: жировую, некротическую и внешнюю ткань помещают в неблагоприятную чашку.

8.3.27 Рассекают опухоль, используя сочетание скальпеля и/или щипцов, разрезают образец опухоли на однородные фрагменты соответствующих размеров (до 6 промежуточных фрагментов). Примечание: для сохранения внутренней структуры опухоли, используют только вертикальное давление резания. Не режут пилящим движением скальпеля. Примечание: убеждаются, что нерассеченные промежуточные фрагменты поддерживаются полностью погруженными в “среду для промывки опухоли” (приготовленную на Стадии 8.2.4).

8.3.28 Перенос промежуточных фрагментов опухоли. Переносят каждый промежуточный фрагмент в чашку “удерживание” со стадии 8.3.8.

8.3.29 Рассечение фрагментов опухоли. Манипулируют с одним промежуточным фрагментом за раз, рассекают промежуточный фрагмент опухоли в чашке для рассечения на кусочки размером приблизительно 3×3×3 мм, сводя к минимуму количество геморрагических, некротических и/или жировых тканей на каждом кусочке. Примечание: для сохранения внутренней структуры опухоли, используют только вертикальное давление. Не режут с помощью пилящего движения скальпеля.

8.3.30 Выбор кусочков опухоли. Выбирают до восьми (8) кусочков опухоли без геморрагической, некротической и/или жировой ткани. Используют линейку для сравнения. Продолжают рассечение до тех пор, пока не будут получены 8 благоприятных кусочков, или не будет рассечен весь промежуточный фрагмент. Переносят каждый выбранный кусочек в одну из капель «среды для промывки опухоли», приготовленной на Стадии 8.3.19.

8.3.31 Хранение промежуточных фрагментов для предотвращения высыхания. После выбора до возьми (8) кусочков из промежуточного фрагмента, помещают остатки промежуточного фрагмента в новую единственную лунку “благоприятные промежуточные фрагменты” 6-луночного планшета, приготовленного на Стадии 8.3.7. Примечание: жировую или некротическую ткань помещают в чашку “неблагоприятные фрагменты” (приготовленную на Стадии 8.3.6).

8.3.32 Повторение рассечения промежуточных фрагментов. Переходят к следующему промежуточному фрагменту, повторяют Стадии 8.3.29-8.3.31 до тех пор, пока все промежуточные фрагменты не будут обработаны, получая при необходимости свежие скальпели и щипцы.

8.3.33 Сбор определенного количества кусочков. Если остается желаемая ткань, выбирают дополнительные благоприятные кусочки опухоли из 6-луночного планшета “благоприятные промежуточные фрагменты” для заполнения капель, максимум до 50 кусочков. Регистрируют общее количество полученных рассеченных кусочков. Примечание: убеждаются, что промежуточные фрагменты опухоли поддерживаются гидратированными средой для промывки, как это необходимо в ходе рассечения. Регистрируют общее количество собранных рассеченных кусочков.

8.3.34 Удаление конической пробирки из инкубатора. Удаляют 50-мл коническую пробирку “кусочки ткани” из инкубатора. Регистрируют время на Стадии 8.1.29. Убеждаются, что коническая пробирка нагревается в течение ≥ 30 мин.

8.3.35 Приготовление конической пробирки. Переносят 50-мл коническую пробирку “кусочки ткани” в BSC, убеждаются, что не ослабляется стерильность открытых обрабатываемых поверхностей.

8.3.36 Перенос кусочков опухоли в 50-мл коническую пробирку. Используя пипетку для переноса, скальпель, щипцы или их сочетание, переносят выбранные 50 наилучших фрагментов опухоли из благоприятных крышек чашки в 50-мл коническую пробирку “кусочки ткани”.

Примечание: если кусочек опухоли теряется в ходе переноса и остается желаемая ткань, добавляют дополнительные кусочки из лунок с благоприятными промежуточными фрагментами опухоли. Регистрируют количество кусочков.

8.3.37 Приготовление BSC для G-REX100MCS. Удаляют все ненужные объекты из BSC для засева емкости, оставляют благоприятные планшеты с тканями, если они содержат дополнительные фрагменты.

8.3.38 Удаление G-REX100MCS из инкубатора. Удаляют G-Rex100MCS, содержащие среды, из инкубатора. Заканчивают Стадию 8.1.29.

8.3.39 Перенос колбы в BSC. Асептически переносят колбу G-Rex100MCS в BSC. Примечание: когда переносят колбу, ее не удерживают за крышку или за дно емкости. Емкость переносят посредством манипуляций с боковыми сторонами. Примечание: использовать только IPA WIPES, при манипуляциях с колбами G-Rex.

8.3.40 Добавление фрагментов опухоли в колбу G-Rex100MCS. В BSC, поднимают колпачок колбы G-Rex100MCS, убедившись, что сохраняется стерильность внутренних трубок.

Взбалтывают коническую пробирку с кусочками опухоли для суспендирования и быстро выливают содержимое в колбу G-Rex100MCS.

8.3.41 Равномерное распределение кусочков. Убеждаются, что кусочки опухоли равномерно распределены по мембране колбы. Осторожно наклоняют колбу вперед и назад, при необходимости, для равномерного распределения кусочков опухоли.

8.3.42 Регистрация общего количества фрагментов опухоли в емкости. Регистрируют количество фрагментов опухоли на нижней мембране емкости и количество фрагментов, наблюдаемых как всплывающие в емкости. Примечание: если количество высевных фрагментов НЕ эквивалентно количеству собранных на Стадии 8.3.36Н, обращаются к локальному управлению и документу в Секции 10.0.

8.3.43 Инкубирование колбы G-Rex. G-Rex100MCS инкубируют при следующих параметрах: инкубируемая колба G-Rex: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процент CO_2 : $5,0 \pm 1,5\%$ CO_2

8.3.44 Вычисление окна инкубирования. Осуществляют вычисление для определения соответствующего времени для удаления G-Rex100MCS из инкубатора в День

11. Вычисления: время инкубирования; нижний предел = время инкубирования + 252 часов; верхний предел = время инкубирования + 276 часов

8.3.45 Мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

8.3.46 Утилизация материалов. Оставшиеся не нагретую среду хранят при 2-8°C и маркируют. После завершения процесса, утилизируют любые оставшиеся нагретую среду и оттаявшие аликвоты IL-2.

8.3.47 Подача образца. Убеждаются, что все образцы в День 0 подаются на Вход и переносятся в LIMS.

8.3.48 Обзор Секции 8.3.

8.4 День 11 - Приготовление сред

8.4.1 Проверяют санитарное состояние помещения, очистку линии и материалы. Подтверждают, санитарную обработку помещения, очистку линии и то, что материалы в пределах срока годности.

8.4.2 Таблица предварительного процессирования. Список оборудования: BSC; весы; запаиватель магистралей Sebra; устройство для удаления сред и извлечения клеток Gatherex™; убеждаются, что предусмотренная карточка QA помещается на соответствующем BSC; убеждаются, что номер партии, предусмотренной карточки QA и демонстрируемый ID пациента соответствуют номеру партии и ID пациента в этой записи загрузки.

8.4.3 Мониторинг инкубатора. Отслеживают инкубатор. Параметры инкубатора:

Температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂. Примечание: действия Секции 8.4 могут осуществляться одновременно с действиями Секциями 8.5.

8.4.4 Нагреваемые среды. Нагревают 3×1000-мл бутылки сред RPMI 1640 (W3013112) и 3×1000-мл бутылки AIM-V (W3009501) в инкубаторе в течение ≥ 30 минут. Регистрируют время. Среды: RPMI 1640 и AIM-V. Примечание: помещают дополнительную 1×1000-мл бутылку среды AIM-V (W3009501) при комнатной температуре для использования на Стадии 8.5.34. Маркируют бутылку “только разбавления для счета клеток” и регистрируют номер партии загрузки.

8.4.5 Мониторинг окружающей среды. Перед предварительным процессированием, убеждаются, что осуществляется мониторинг окружающей среды перед процессом согласно SOP-00344.

8.4.6 Удаление среды RPMI 1640 из инкубатора. Удаляют среду RPMI 1640, когда достигается соответствующее время. Регистрируют конечное время инкубирования на Стадии 8.4.4. Убеждаются, что среда нагревается в течение ≥ 30 мин.

8.4.7 Приготавливают сред RPMI 1640. В BSC, удаляют 100,0 мл из каждой из трех предварительно нагретых 1000-мл бутылок со средой RPMI 1640 и помещают в контейнер соответствующего размера, маркированный “Отходы”.

8.4.8 В BSC добавляют реагенты в бутылку со средой RPMI 1640. В BSC добавляют следующие реагенты в каждую из трех бутылок со средой RPMI 1640. Регистрируют

объемы, добавленные в каждую бутылку: сыворотка человека GemCell, термически дезактивированная, Тип АВ (100,0 мл), GlutaMax (10,0 мл), гентамицин сульфат, 50 мг/мл (1,0 мл), 2-меркаптоэтанол (1,0 мл)

8.4.9 Фильтрация сред. Закрывают бутылки со Стадии 8.4.8 и взбалтывают, чтобы убедиться, что реагенты тщательно перемешаны. Фильтруют каждую бутылку среды через отдельный 1-л 0,22-микронный узел фильтра.

8.4.10 Маркировка фильтрованной среды. Асептически закрывают отфильтрованные среды и маркируют каждую бутылку как среда CM1, День 11.

8.4.11 Оттаивание аликвоты IL-2. Оттаивают 3×1,1 мл аликвоты IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) (BR71424) пока весь лед не растает. Регистрируют № партии и срок годности IL 2.

Примечание: убеждаются, что этикетка IL-2 прикреплена.

8.4.12 Удаление среды AIM-V из инкубатора. Удаляют три бутылки среды AIM-V из инкубатора. Регистрируют конечное время инкубирования на Стадии 8.4.4. Убеждаются, что среда нагревается в течение ≥ 30 минут.

8.4.13 Добавление IL-2 в AIM-V. В BSC, используя микропипетку, добавляют 3,0 мл оттаявшего IL-2 в одну 1-л бутылку предварительно нагретой среды AIM-V. Промывают наконечник микропипетки средой после распределения IL-2. Используют новый стерильный наконечник микропипетки для каждой аликвоты. Регистрируют общий добавленный объем. Маркируют бутылку как “AIM-V, содержащая IL-2”.

8.4.14 Перенос материалов. Асептически переносят 10-л мешок Labtainer и комплект для переноса с насосом REPEATER в BSC.

8.4.15 Приготовление 10-л мешка Labtainer для среды. Закрывают все линии на 10-л мешке Labtainer. Присоединяют край трубки с большим диаметром комплекта для переноса с насосом REPEATER к среднему принимающему узлу 10-л мешка Labtainer с помощью соединения Луэр-лок.

8.4.16 Подготовка насоса Ваха. Устанавливают насос Ваха после BSC. Проводят трубки установки переноса через насос Ваха, расположенный вне BSC.

Устанавливают насос Ваха на “Высокое” и “9”.

8.4.17 Приготовление 10-л мешка Labtainer для среды. В BSC, удаляют шприц из системы для распределения жидкости Pumpmatic (PLDS) и утилизируют. Примечание: убеждаются, что стерильность пипетки PLDS не ослабляется.

8.4.18 Приготовление 10-л мешка Labtainer для среды. Соединяют пипетку PLDS с краем с меньшим диаметром комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER с помощью соединения Луэр-лок и помещают наконечник пипетки в бутылку со средой. AIM-V, содержащей IL-2 (приготовленной на Стадии 8.4.13) для отсоса. Открывают все зажимы между бутылкой со средой и 10-л мешком Labtainer.

8.4.19 Закачка среды в 10-л мешок Labtainer. В BSC, используя PLDS, переносят предварительно нагретую среду AIM-V, содержащую IL-2, приготовленную на Стадии 8.4.13, а также две дополнительные бутылки с AIM-V в 10-л мешок Labtainer. Добавляют три бутылки фильтрованной среды CM1, День 11, со стадии 8.4.10. После добавления

последней бутылки, очищают линию к мешку. Примечание: останавливают насос между добавлениями бутылок среды.

8.4.20 Удаление Pumpmatic из мешка Labtainer. Удаляют PLDS из комплекта для переноса и помещают красный колпачок на Луэр-лок линии в BSC.

8.4.21 Смешивание сред. Осторожно массируют мешок для перемешивания.

8.4.22 Маркировка сред. В BSC, маркируют мешок со средой посредством следующей информации. Срок годности составляет 24 часа от даты приготовления.

8.4.23 Отбор образцов сред согласно плану работы с образцами. В BSC, присоединяют 60-мл шприц к доступному принимающему узлу мешка “полная среда CM2, День 11”, приготовленного на Стадии 8.4.22. Удаляют 20,0 мл среды и помещают в 50-мл коническую пробирку.

Помещают красный колпачок на принимающий узел мешка “полная среда CM2, День 11”.

8.4.24 Маркировка и хранение образца. Маркируют маркировкой согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят образец сохраняемых сред при 2-8°C до подачи на Вход для исследования.

8.4.25 Переход к отбору образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS осуществлен, до удаления образца.

8.4.26 Герметизация линии комплекта для переноса. Вне BSC, термически разгерметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) красный колпачок на линии комплекта для переноса, вблизи красного колпачка. Удерживают установку для переноса на мешке.

8.4.27 Приготовление пробирок для разбавления для счета клеток. В BSC, добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая обозначена “разбавления для счета клеток” и номером партии для четырех 15-мл конических пробирок. Маркируют пробирки номером партии и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криофлакона как “фидеры” и номером флакона (1-4). Выдерживают флаконы в BSC для использования на Стадии 8.5.30.

8.4.28 Перенос реагентов из BSC в 2-8°C. Переносят любые оставшиеся 2-меркаптоэтанол, GlutaMax и сыворотку человека из BSC в 2-8°C. Убеждаются, что все реагенты маркированы зарегистрированным номером партии загрузки и соответствующим открытым сроком годности согласно Примечанию к процессу 5.9.

8.4.29 Приготовление 1-л транспортной упаковки. Вне сварного шва BSC (согласно Примечанию к процессу 5.11) присоединяют 1-л транспортную упаковку к комплекту для переноса, присоединенному к мешку “полная среда CM2, День 11”, приготовленному на Стадии 8.4.22. Маркируют транспортную упаковку как “среда CM2 для клеток-фидеров” и номером партии.

8.4.30 Приготовление 1-л транспортной упаковки. Делают отметку на трубке 1-л транспортной упаковки за несколько дюймов от мешка. Помещают пустую транспортную упаковку на весы так, что трубка находится на весах до отмеченной точки.

8.4.31 Тарировка весов. Тарируют весы и оставляют пустую транспортную упаковку на весах.

8.4.32 Приготовление транспортной упаковки для клеток-фидеров. Устанавливают насос Ваха на “среднее” и “4.” Перекачивают $500,0 \pm 5,0$ мл “полной среды CM2, День 11”, приготовленной на Стадии 8.4.22, в транспортную упаковку “Среда CM2 для клеток”. Отмеряют по массе и регистрируют объем полной среды CM2, добавляемой в транспортную упаковку.

8.4.33 Термическая герметизация линии. После заполнения, термически герметизируют линию согласно Примечанию к процессу 5.12. Отделяют мешок для среды CM2, День 11, с комплектом для переноса от транспортной упаковки для сред для клеток-фидеров, заваривают 1-л транспортную упаковку.

8.4.34 Если это применимо: инкубирование транспортной упаковки сред для клеток-фидеров. Если это применимо, помещают транспортную упаковку “среда CM2 для клеток-фидеров” в инкубатор до использования на Стадии 8.6.6.

8.4.35 Инкубирование полной среды CM2, День 11. Помещают “полная среда CM2, День 11”, приготовленную на Стадии 8.4.22, в инкубатор до использования на Стадии 8.7.2.

8.4.36 Обзор секции 8.4.

8.5 День 11 - сбор TIL

8.5.1 Таблица предварительного процессирования. Отслеживают инкубатор. Параметры инкубатора: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$; процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂.

Примечание: действия Секции 8.5 могут осуществляться одновременно с действиями Секции 8.4 и 8.6.

8.5.2 Удаление G-Rex100MCS из инкубатора. Осуществляют проверку, чтобы убедиться, что параметры инкубирования соответствуют перед удалением G-Rex100MCS из инкубатора. Нижний предел со Стадии 8.3.44 В. Верхний предел со Стадии 8.3.44 С.

регистрают время удаления из инкубатора. Определяют: удовлетворяет ли это время условию $8.3.44 \text{ В} \leq \text{время удаления из инкубатора} < \text{Стадия } 8.3.44 \text{ С}$. *если нет, обращаются к локальному управлению. Осторожно удаляют G-Rex100MCS из инкубатора и убеждаются, что все зажимы закрыты за исключением линии большого фильтра. Регистрируют время начала процессирования.

8.5.3 Приготовление 300-мл транспортной упаковки. Маркируют 300-мл транспортную упаковку как “суспензия TIL”.

8.5.4 Приготовление 300-мл транспортной упаковки. Стерильно заваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) транспортную линию для суспензии TIL (одну линию) гравитационного фильтра для крови. Смотри, например.

8.5.5 Приготовление 300-мл транспортной упаковки. Помещают 300-мл транспортную упаковку на весы и регистрируют сухую массу.

8.5.6 Приготовление 1-л транспортной упаковки. Маркируют 1-л транспортную упаковку как “супернатант” и номером партии.

8.5.7 Заваривание транспортных упаковок для G-Rex100MCS. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию для удаления среды от G-Rex100MCS к транспортной упаковке “супернатант”. Стерильно приваривают прозрачную линию для удаления клеток от G-Rex100MCS к одной из двух импульсных линий в верхней части фильтра для крови, соединенных с транспортной упаковкой “суспензии TIL”, приготовленной на Стадии 8.5.4. Смотри, например.

8.5.8 Установка GatheRex. Помещают G-Rex100MCS по левую сторону от GatheRex, а транспортные упаковки “супернатант” и “суспензии TIL” по правую сторону от него.

8.5.9 Установка GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления среды от G-Rex100MCS до верхнего зажима (маркированного красной линией) и направляющих трубок на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора от G-Rex100MCS до нижнего зажима (маркированной голубой линией) и направляющих трубок на GatheRex.

8.5.10 Установка GatheRex. Присоединяют газовую линию от GatheRex к стерильному фильтру колбы G-Rex100MCS. Примечание: перед удалением супернатанта из колбы G-Rex100MCS, убеждаются, что все зажимы на линиях удаления клеток закрыты.

8.5.11 Уменьшение объема G-Rex100MCS. Переносят ~900 мл супернатанта культуры из G-Rex100MCS в 1-л транспортную упаковку. Визуально проверяют колбу G-Rex100MCS, чтобы убедиться, что колба имеет некоторый уровень и что количество среды уменьшается в конце отсоса с помощью погруженной трубки. Примечание: если Gatherex останавливается преждевременно, его включают опять, нажимая на кнопку со стрелкой, направленной вправо, показывающей возобновление работы.

8.5.12 Приготовление колбы для Сбора TIL. После удаления супернатанта, закрывают все зажимы до красной линии.

8.5.13 Начало Сбора TIL. Регистрируют время начала сбора TIL.

8.5.14 Начало Сбора TIL. Энергично встряхивают колбу и взбалтывают среды для высвобождения клеток. Осуществляют осмотр колбы, чтобы убедиться, что все клетки отсоединились. Примечание: обращаются к локальному управлению, если клетки не отсоединяются.

8.5.15 Начало Сбора TIL. Наклоняют колбу от трубок для сбора и дают возможность для осаждения кусочков опухоли вдоль края. Медленно опорожняют колбу в направлении трубок для сбора так что кусочки остаются на противоположной стороне колбы. Примечание: если трубочка для сбора клеток не находится на соединении стенки мембраны на дне, встряхивания колбы, когда она наклонена под углом 45°, обычно достаточно для правильного позиционирования трубочки.

8.5.16 Сбор TIL. Открывают все зажимы, ведущие к транспортной упаковке для суспензии TIL.

8.5.17 Сбор TIL. Используя GatheRex, переносят суспензию клеток через фильтр для крови в 300-мл транспортную упаковку. Примечание: убеждаются в сохранении наклона края пока не будут собраны все клетки и среды.

8.5.18 Сбор TIL. Осматривают мембрану относительно прилипших клеток.

8.5.19 Промывка мембраны колбы. Промывают дно G-Rex100MCS. Покрывают ~1/4 газообменной мембраны средой для промывки. Примечание: если кусочки опухоли забивают линию для сбора, прекращают на время сбор, нажимая на “X” на линии для сбора клеток. Нажимают на кнопку “открытие зажимов” на Gatherex и подхватывают транспортную упаковку вверх и осторожно выжимают ее с помощью увеличения давления пока фрагмент не будет удален. Нельзя сжимать мешок слишком сильно, поскольку это может вызывать разрыв линии или мешка. Возобновляют сбор после удаления забивания.

8.5.20 Закрывание зажимов на G-Rex100MCS. Убеждаются, что все зажимы закрыты.

8.5.21 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) транспортную упаковку для суспензии TIL настолько близко к сварному шву, насколько это возможно, так что общая длина трубки остается приблизительно такой же.

8.5.22 Термическая герметизация. Термически герметизируют транспортную упаковку “супернатант” согласно Примечанию к процессу 5.12. Оставляют достаточную длину линии до сварного шва.

8.5.23 Вычисление объема суспензии TIL. Регистрируют массу транспортной упаковки суспензии TIL и вычисляют объем суспензии клеток.

8.5.24 Приготовление транспортной упаковки Супернатанта для Отбора образцов. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) 4-дюймовый комплект для переноса плазмы к транспортной упаковке “супернатант”, оставляя Луер-лок в 4-дюймовом комплекте для переноса плазмы, и переносят ее в BSC.

8.5.25 Приготовление транспортной упаковки суспензии TIL для отбора образцов. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) 4-дюймовую установку для переноса плазмы к 300-мл транспортной упаковке “суспензия TIL”, сохраняя Луер-лок на 4-дюймовой установке для переноса плазмы, и переносят ее в BSC.

8.5.26 Набор образца ВасТ. В BSC, используя шприц соответствующего размера, набирают приблизительно 20,0 мл супернатанта из 1-л транспортной упаковки “супернатант” и распределяют в стерильную 50-мл коническую пробирку, маркированную “ВасТ.” Сохраняют в BSC для использования на Стадии 8.5.27.

8.5.27 Инокуляция ВасТ согласно плану работы с образцами. Удаляют 1,0 мл образца из 50-мл конической пробирки, маркированной ВасТ, приготовленной на Стадии 8.5.26, используя шприц соответствующего размера, и инокулируют анаэробную бутылку. Регистрируют время инокуляции бутылки, используя место, предусмотренное на этикетке бутылки. Повторяют указанное выше для аэробной бутылки. Примечание: эта стадия может осуществляться вне последовательности.

8.5.28 Маркировка и хранение образца. Образец ВасТ маркируют с помощью маркировки согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят его при комнатной температуре, защищенным от света до подачи на Вход для исследования

согласно плану работы с образцами. Примечание: не закрывайте штрихкод бутылки надписями.

8.5.29 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS выполнен до удаления образца.

8.5.30 Образцы TIL для счета клеток. Маркируют 4 криофлакона с помощью номера флакона (1-4).

Используя отдельные 3-мл шприцы, набирают 4×1,0 мл образцы для счета клеток из транспортной упаковки суспензии TIL, используя Луер-лок, и помещают их в соответствующие криофлаконы.

8.5.31 Закрывание соединения Луэр-лок. Помещают на линию красный колпачок (W3012845).

8.5.32 Инкубирование TIL. Помещают транспортную упаковку TIL в инкубатор до появления потребности.

8.5.33 Осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Получают начальные отсчеты клеток без разбавления.

8.5.34 Регистрация объемов образцов для счета клеток. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0.

8.5.35 Определение Коэффициента умножения. Общий объем образца для счета клеток: 8.5.34A + 8.5.34B. Коэффициент умножения $C \div 8.5.34A$.

8.5.36 Выбор протоколов и вводимых коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образца и разбавителя. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.5.37 Регистрация имени файла, жизнеспособности и отсчетов клеток согласно Nucleoview

8.5.38 Определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности, отсчетов клеток. Жизнеспособность $(8.5.37A + 8.5.37B) \div 2$. Концентрация жизнеспособных клеток $(8.5.37C + 8.5.37D) \div 2$

8.5.39 Определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов. Нижний предел: $8.5.38F \times 0,9$. Верхний предел: $8.5.38F \times 1,1$.

8.5.40 Определение того, находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах Нижний предел: $8.5.37 C \text{ и } D \geq 8.5.39G$. Верхний предел: $8.5.37 C \text{ и } D \leq 8.5.39H$. *Если любой из результатов представляет собой “Нет” осуществляют вторую серию отсчетов на стадиях 8.5.41-8.5.48*.

8.5.41 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Примечание: разбавление регулируется согласно ожидаемой концентрации клеток

8.5.42 Если это применимо: Регистрация объемов образцов для счета клеток.

8.5.43 Если это применимо: определение Коэффициента умножения. Общий объем образца для отсчета клеток: $8.5.42A + 8.5.42B$. Коэффициент умножения $C \div 8.5.42A D$

8.5.44 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что протокол “анализа отсчетов жизнеспособных клеток” выбран, все коэффициенты умножения и объемы образца и разбавителя введены. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0.

8.5.45 Если это применимо: регистрируют отсчеты клеток согласно Nucleoview

8.5.46 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности отсчетов клеток. Определяют среднюю концентрацию. жизнеспособных клеток.

8.5.47 Если это применимо: определяют верхний и нижний пределы для отсчетов. Нижний предел: $8.5.46F \times 0,9$. Верхний предел: $8.5.46F \times 1,1$.

8.5.48 Если это применимо: Определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах. Нижний предел: $8.5.45 C \text{ и } D \geq 8.5.47G$. Верхний предел: $8.5.45 C \text{ и } D \leq 8.5.47H$. Примечание: если любой из результатов представляет собой «Нет», переходят на Стадию 8.5.49 для определения среднего значения.

8.5.49 Если это применимо: определение средней концентрация жизнеспособных клеток от всех четырех отсчетов. Средняя концентрация жизнеспособных клеток $(A+B+C+D) \div 4 = \text{Average}$

8.5.50 Регулировка объема суспензии TIL. Вычисляют установленный объем суспензии TIL после удаления образцов для счета клеток. Общий объем клеток TIL со стадии 8.5.23C (A). Объем удаленного образца для счета клеток (4,0 мл) (B) установленный общий объем клеток TIL $C=A-B$.

8.5.51 Вычисление жизнеспособных клеток TIL в целом. Среднее значение концентрации жизнеспособных клеток*: $8.5.38 F^*$ или $8.5.46 F^*$ или $*8.5.49E^*$; общий объем: 8.5.50; общее количество жизнеспособных клеток: $C = A \times B$. *Отмеченная ссылка используется для определения Концентрации жизнеспособных клеток. Примечание: если общее количество жизнеспособных клеток TIL $< 5 \times 10^6$ клеток, обращаются к локальному управлению и переходят на Стадию 8.7.1. Если общее количество жизнеспособных клеток TIL $> 5 \times 10^6$, переходят на Стадию 8.5.52.

8.5.52 Вычисление для проточной цитометрии. Если общий отсчет жизнеспособных клеток TIL со Стадии $8.5.51C \geq 4,0 \times 10^7$, вычисляют объем для получения $1,0 \times 10^7$ клеток для образца для проточной цитометрии. *Если имеется $< 4,0 \times 10^7$ клеток, остальные поля в Таблице представляют собой “Нет”. Переходят на Стадию 8.7.1. Общее количество жизнеспособных клеток необходимых для проточной цитометрии: $1,0 \times 10^7$ клеток. Объем клеток необходимый для проточной цитометрии: концентрация жизнеспособных клеток из 8.5.51 деленная на $1,0 \times 10^7$ клеток A.

8.5.53 Если это применимо: удаление TIL из инкубатора. Удаляют суспензию TIL из инкубатора и регистрируют конечное время инкубирования на Стадии 8.5.32.

8.5.54 Если это применимо: удаление образца для проточной цитометрии согласно плану работы с образцами. Используя шприц соответствующего размера, удаляют вычисленный объем (8.5.52 С) для фенотипирования образца из транспортной упаковки суспензии ТПЛ и помещают в 50-мл коническую пробирку.

8.5.55 Если это применимо: регистрация и хранение образца для проточной цитометрии. Маркируют с помощью маркировки согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и сохраняют образец для проточной цитометрии при 2-8°C до подачи на Вход для исследования согласно плану работы с образцами.

8.5.56 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS выполнен до удаления образца.

8.5.57 Если это применимо: повторное вычисление общего количества жизнеспособных клеток и объемного потока. Вычисляют оставшееся общее количество жизнеспособных клеток и оставшийся объем после удаления образца для цитометрии, ниже.

Параметр	Формула	Результат
Общее количество жизнеспособных клеток ТПЛ	Стадия 8.5.51С	А. клеток
ТПЛ, удаленные для проточной цитометрии	1×10^7 клеток	В. 1×10^7 клеток
Оставшееся общее количество жизнеспособных клеток ТПЛ	$C = A - B$	С. клеток
Объем ТПЛ	Стадия 8.5.50С	Д. мл
Объем удаленных ТПЛ	Стадия 8.5.52 С	Е. мл
Оставшийся объем ТПЛ	$F = D - E$	Ф. мл

8.5.58 Если это применимо: вычисление объема ТПЛ. Вычисляют объем суспензии ТПЛ равный $2,0 \times 10^8$ жизнеспособных клеток.

Общее количество необходимых жизнеспособных клеток	Концентрация жизнеспособных клеток со стадии 8.5.51А	Объем суспензии ТПЛ, содержащей $2,0 \times 10^8$ жизнеспособных клеток $C = A \div B$
А. $2,0 \times 10^8$ клеток	В. клеток/мл	С. мл

8.5.59 Если это применимо: вычисление объема ТПЛ для удаления. Вычисление избыточного объема клеток ТПЛ для удаления.

Общий объем суспензия ТПЛ со стадии 8.5.57F	Объем суспензии, содержащей $2,0 \times 10^8$ ТПЛ со стадии 8.5.58С	Объем избыточных ТПЛ для удаления $C = A - B$
А. мл	В. мл	С. мл

8.5.60 Если это применимо: удаление избытка ТПЛ. В BSC, используя шприц соответствующего размера, удаляют вычисленный объем (Стадия 8.5.59С) из транспортной упаковки суспензии ТПЛ. Примечание: шприц не используют больше одного раза. Если это применимо, используют множество шприцов. Помещают в стерильный контейнер

соответствующего размера и отмечают дату и номер партии. Помещают красный колпачок на линию транспортной упаковки “суспензия ТП”.

8.5.61 Если это применимо: помещение ТП в инкубатор. Помещают транспортную упаковку для суспензии ТП в инкубатор до необходимости. Регистрируют время.

8.5.62 Если это применимо: вычисления. Вычисляют общее количество удаленных избыточных ТП. Стадия 8.5.51А. Объем ТП для удаления со стадии 8.5.59С. Вычисление общего количества удаляемых избыточных ТП.

Концентрация жизнеспособных клеток со Стадии 8.5.51А	Объем ТП для удаления со стадии 8.5.59С	Общее количество удаленных избыточных ТП $C = A \div B$
А. клеток/мл	В. мл	С. клеток

8.5.63 Если это применимо: Вычисления. Вычисляют количество среды CS-10 для добавления к избыточным клеткам ТП со стадии 8.5.62С. Целевая концентрация клеток для замораживания составляет $1,0 \times 10^8$ клеток/мл.

Общее количество удаленных избыточных ТП Стадия 8.5.62С	Целевая концентрация для замораживания	Объем CS-10 для добавления (мл) $C = A \div B$
А. клеток	В. $1,0 \times 10^8$ клеток/мл	С. мл

8.5.64 Если это применимо: центрифугирование избыточных ТП. Центрифугируют избыток суспензии клеток ТП. Скорость: $350 \times g$. Время: 10:00 минут. Температура: температура окружающей среды. Торможение: полное (9). Ускорение: полное (9).

8.5.65 Если это применимо: наблюдение конической пробирки. Регистрируют наблюдения: имеется ли осадок. Является ли прозрачным супернатант. *Примечание: если любой из ответов представляет собой “Нет”, обращаются к локальному управлению.

8.5.66 Если это применимо: добавление CS-10. В BSC, асептически отсасывают супернатант. Осторожно вращают пробирки для повторного суспендирования клеток в оставшейся текучей среде.

8.5.67 Если это применимо: добавление CS10. Медленно добавляют объем CS10, вычисленный на Стадии 8.5.63С

8.5.68 Если это применимо: регистрация флаконов. Маркируют флаконы с помощью предусмотренных обозначений QA. Присоединяют этикетку образца.

8.5.69 Если это применимо: заполнение флаконов. Аликвотируют 1,0 мл суспензии клеток в криофлаконы соответствующего размера. Примечание: не заполняют более 10 флаконов избыточными ТП.

8.5.70 Если это применимо: заполнение флаконов. Аликвотируют остаточный объем в криофлакон соответствующего размера согласно SOP-00242. Если объем $\leq 0,5$ мл, добавляют CS10 во флакон до объема 0,5 мл.

8.5.71 Если это применимо: заполнение флаконов. Заполняют один флакон 1,0 мл CS10, и отмечают как “Пустой”.

8.5.72 Если это применимо: регистрируют количество заполненных флаконов. Зарегистрированное количество заполненных флаконов, ниже, не включает пустой. 8.5.73

Если это применимо: мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

Криоконсервирование образца ТП

8.5.74 Если это применимо: вычисление объема для криоконсервирования. Вычисляют объем клеток, необходимый для получения 1×10^7 клеток для криоконсервирования.

Общее количество жизнеспособных клеток ТП, необходимых для криоконсервирования	Концентрация жизнеспособных клеток со Стадии 8.5.51А	Объем клеток, необходимый для криоконсервирования $C=A \div B$
A. $1 \square 10^7$ клеток	B. клеток/мл	C. мл

8.5.75 Если это применимо: удаление образца для криоконсервирования. В BSC, используя шприц соответствующего размера, удаляют вычисленный объем (Стадия 8.5.74C) из транспортной упаковки для суспензии ТП. Помещают его в коническую пробирку соответствующего размера и маркируют как “образец с 1×10^7 клеток для криоконсервирования”, регистрируют дату и номер партии. Помещают красный колпачок (W3012845) на транспортную упаковку суспензии ТП.

8.5.76 Если это применимо: помещение ТП в инкубатор. Помещают транспортную упаковку суспензии ТП в инкубатор до появления необходимости.

8.5.77 Если это применимо: криоконсервирование образца. Центрифугируют “образец с 1×10^7 клеток для криоконсервирования” согласно следующим параметрам:

Скорость: $350 \times g$, время: 10:00 минут, температура: окружающей среды. Торможение: полное (9). Ускорение: полное (9). Примечание: убеждаются, что на центрифуге выбраны правильные единицы скорости и времени.

8.5.78 Если это применимо: наблюдение конической пробирки. Регистрируют наблюдения: имеется ли осадок. Является ли прозрачным супернатант. *Примечание: если любой из ответов представляет собой “Нет”, обращаются к локальному управлению.

8.5.79 Если это применимо: добавление CS-10. В BSC, асептически отсасывают супернатант. Осторожно поворачивают дно пробирки для повторного суспендирования клеток в оставшейся текучей среде.

8.5.80 Если это применимо: добавление CS-10. Медленно добавляют 0,5 мл CS10. Регистрируют добавленный объем.

8.5.81 Если это применимо: регистрация флакона. Маркируют флакон, маркировкой, выданной QA.

8.5.82 Если это применимо: заполнение флаконов. Аликвотируют повторно суспендированный объем в маркированный криофлакон.

8.5.83 Если это применимо: заполнение пустого образца. Заполняют другой флакон 0,5 мл CS10 и маркируют как “Пустой”.

8.5.84 Если это применимо: Регистрация количества заполненных флаконов, не включая “пустой”. Заполняют флаконы образцами для криоконсервирования при $\sim 0,5$ мл

8.5.85 Если это применимо: мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

8.5.86 Обзор Секции 8.5

8.6 День 11 - Клетки-фидеры

8.6.1 Получение клеток-фидеров. Получают 3 мешка клеток-фидеров, по меньшей мере, с двумя различными номерами партий из морозилки LN2. Клетки держат на сухом льду до готовности к оттаиванию. Примечание: действия секции 8.6 могут осуществляться одновременно с действиями Секции 8.5.

8.6.2 Получение клеток-фидеров. Регистрируют информацию о клетках-фидерах. Подтверждают, что получены, по меньшей мере, две различные партии клеток-фидеров.

8.6.3 Приготовление водяной бани или Cryotherm. Приготавливают водяную баню или Cryotherm для оттаивания клеток-фидеров.

8.6.4 Оттаивание клеток-фидеров. Мешки с клетками-фидерами помещают в отдельные верхние мешки на молнии, на основании номера партии и оттаивают на водяной бане $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ или Cryotherm в течение ~3-5 минут или пока лед не исчезнет. Регистрируют времена оттаивания с таймера, ниже.

8.6.5 Приготовление связки для клеток-фидеров. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) 4S-4M60 к комплекту Cell Connect CC2 (W3012820), заменяя единственный штырек устройства Cell Connect (B) с 4-штырьковым концом коллектора 4S-4M60 при (G). Сваривают H с G.

8.6.6 Если это применимо: удаление среды из инкубатора. Удаляют транспортную упаковку для среды CM2 для клеток-фидеров, приготовленную на Стадии 8.4.34, из инкубатора.

8.6.7 Присоединение транспортной упаковки для среды. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) транспортную упаковку “среды CM2 для клеток-фидеров” к Луэр-локу CC2. Примечание: мешок будет присоединяться к стороне связки с узлом для безыгольных инъекций.

8.6.8 Перенос связки. Сборку, содержащую полную среду CM2, День 11, переносят в BSC.

8.6.9 Набор оттаявших клеток-фидеров. В BSC, набирают 10 мл воздуха в 100-мл шприц. Используют его для замены 60-мл шприца CC2.

8.6.10 Набор оттаявших клеток-фидеров. Протирают каждый узел на мешках для клеток-фидеров тампоном со спиртом перед удалением покрытия. Соединяют штырьками три мешка для фидеров, используя три штырька из CC2. Примечание: поддерживают постоянное давление при вращении штырька в одном направлении. Убеждаются в отсутствии прокола боковой стороны узла.

8.6.11 Набор оттаявших клеток-фидеров. Открывают запорный кран так, что линия от мешков клеток-фидеров открыта, а линия к узлу безыгольной инъекции закрывается.

8.6.12 Набор оттаявших клеток-фидеров. Набирают содержимое мешков с клетками-фидерами в шприц. Все три мешка опорожняют за один раз. После опорожнения мешков

для клеток-фидеров, поддерживая при этом давление на шприце, отключают зажимом линию к мешкам для клеток-фидеров.

8.6.13 Регистрация объема клеток-фидеров. Не отсоединяют шприц ниже, шприц от связки. Регистрируют общий объем клеток-фидеров в шприце.

8.6.14 Добавление клеток-фидеров в транспортную упаковку. Поворачивают запорный кран, так что линия для мешка для клеток-фидеров закрывается, а линия до транспортной упаковки со средой открывается. Убеждаются, что линия до транспортной упаковки со средой не перекрыта зажимами.

8.6.15 Добавление клеток-фидеров в транспортную упаковку. Распределяют клетки-фидеры из шприца в транспортную упаковку “среды CM2 для клеток-фидеров”. Отключают зажимом линию до транспортной упаковки, содержащей клетки-фидеры, и оставляют шприц присоединенным к связке.

8.6.16 Перемешивание набранных клеток-фидеров. Массируют мешок для перемешивания набранных клеток-фидеров в транспортной упаковке.

8.6.17 Маркировка транспортной упаковки. Маркируют мешок как “суспензия клеток-фидеров” и номером партии.

8.6.18 Вычисление общего объема в транспортной упаковке. Вычисляют общий объем суспензии клеток-фидеров.

8.6.19 Удаление образцов для счета клеток. Используя отдельный 3-мл шприц для каждого образца, набирают 4×1,0 мл образца для счета клеток из транспортной упаковки суспензии клеток-фидеров, используя узел безыгольной инъекции. Аликвотируют каждый образец в криофлаконы, маркированные на Стадии 8.4.27. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции стерильным тампоном со спиртом (W3009488) и перемешивают суспензию клеток-фидеров между каждым отбором образцов для счета клеток.

8.6.20 Осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления, используя NC-200 и Примечание к процессу 5.14. Разбавляют образцы для счета клеток посредством добавления 0,5 мл суспензии клеток в 4,5 мл среды AIM-V, маркированных номером партии и как “разбавления для счета клеток”. Это дает разбавление 1:10. Регулируют при необходимости.

8.6.21 Регистрация отсчета клеток. Объемы образцов

8.6.22 Определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий отсчет клеток в объеме образца	8.6.21A + 8.6.21B	C. мкл
Коэффициент умножения	C ÷ 8.6.21A	D.

8.6.23 Выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводятся все коэффициенты умножения и объемы образца и разбавителя.

8.6.24 Регистрация имени файла, жизнеспособности и отсчетов клеток согласно Nucleoview.

8.6.25 Определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.6.24A + 8.6.24B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.6.24C + 8.6.24D) \div 2$	F. клеток/мл

8.6.26 Определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.6.25F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.6.25F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.6.27 Определение того, находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.6.24 C \text{ и } D \geq 8.6.26G$	
Верхний предел	$8.6.24 C \text{ и } D \leq 8.6.26H$	

Примечание: если любой результат представляет собой “Нет” осуществляют второй набор отсчетов на Стадиях 8.6.28-8.6.35.

8.6.28 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисление с использованием NC-200 согласно SOP-00314 и Примечания к процессу 5.14

Примечание: разбавление может регулироваться на основе ожидаемой концентрации клеток.

8.6.29 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток, объемов образцов. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0.

8.6.30 Если это применимо: определение коэффициента умножения.

Параметр	Формула	Результат
Общий отсчет клеток в объеме образца	$8.6.29A + 8.6.29B$	C. мл
Коэффициент умножения	$C \div 8.6.29A$	D.

8.6.31 Выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образца и разбавителя. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0.

8.6.32 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview 8.6.33
Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.6.32A + 8.6.32B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.6.32C + 8.6.32D) \div 2$	F. клеток/мл

8.6.34 Если это применимо: определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.6.33F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.6.33F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.6.35 Если это применимо: определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.6.32\ C \text{ и } D \geq 8.6.34G$	
Верхний предел	$8.6.32\ C \text{ и } D \leq 8.6.34H$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой «Нет», переходят на Стадию 8.6.36 для нахождения общего среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и продолжают вычисления.

8.6.36 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток для всех четырех полученных отсчетов.

8.6.37 Регулировка объемов суспензии клеток-фидеров. Вычисляют установленный объем суспензии клеток-фидеров после удаления образцов для счета клеток. Это общий объем клеток-фидеров со Стадии 8.6.18С минус удаленные 4,0 мл.

8.6.38 Вычисление общего количества жизнеспособных клеток-фидеров.

Параметр	Формула	Результат
Среднее значение концентрации 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	$A \times B$	C. клеток

Если общее количество жизнеспособных клеток $< 5 \times 10^9$, переходят на Стадию 8.6.39. Если общее количество жизнеспособных клеток $\geq 5 \times 10^9$, переходят на Стадию 8.5.70.

8.6.39 Если это применимо: получение дополнительных клеток-фидеров. Получают дополнительный мешок клеток-фидеров из морозилки LN2. Клетки держат на сухом льду до готовности к оттаиванию.

8.6.40 Если это применимо: получение дополнительных клеток-фидеров. Регистрируют информацию о клетках-фидерах.

8.6.41 Если это применимо: оттаивание дополнительных клеток-фидеров. Помещают 4-ый мешок с клетками-фидерами в верхний мешок на молнии и оттаивают на водяной бане при $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ или на Cytotherm в течение ~3-5 минут или пока лед не исчезнет. Регистрируют время оттаивания.

8.6.42 Если это применимо: Набор дополнительных клеток-фидеров. В BSC, набирают 10 мл воздуха в новый 100-мл шприц. Используют его для замены шприца на связке.

8.6.43 Если это применимо: набор дополнительных клеток-фидеров. Протирают узел мешка для клеток-фидеров тампоном со спиртом перед удалением покрытия. Соединяют штырьками мешок для клеток-фидеров, используя один из оставшихся штырьков связки, приготовленной на Стадии 8.6.7 Примечание: поддерживают постоянным давление при

вращении штырька в одном направлении. Убеждаются в отсутствии прокола боковой стороны узла.

8.6.44 Если это применимо: набор дополнительных клеток-фидеров. Открывают запорный кран, так что линия от мешка для клеток-фидеров открывается, а линия до узла безыгольной инъекции закрывается.

8.6.45 Если это применимо: набор дополнительных клеток-фидеров. Набирают содержимое мешка для клеток-фидеров в шприц. Регистрируют объем.

8.6.46 Если это применимо: измерение объема. Измеряют объем клеток-фидеров в шприце и регистрируют ниже (В). Вычисляют новый общий объем клеток-фидеров.

Объем клеток-фидеров со Стадии 8.6.37С	Объем клеток-фидеров со Стадии 8.6.45	Общий объем клеток-фидеров $C=A+B$
А. мл	В. мл	С. мл

8.6.47 Если это применимо: добавление клеток-фидеров в транспортную упаковку. Поворачивают запорный кран так, что линия до мешка для клеток-фидеров закрывается, а линия до транспортной упаковки “суспензия клеток-фидеров” открывается. Убеждаются, что линия до транспортной упаковки не перекрыта зажимами. Распределяют клетки-фидеры из шприца в транспортную упаковку “суспензия клеток-фидеров”. Перекрывают зажимами линию до транспортной упаковки и оставляют шприц присоединенным к связке.

8.6.48 Если это применимо: добавление клеток-фидеров в транспортную упаковку. Массируют мешок для перемешивания набранных клеток-фидеров в транспортной упаковке суспензии клеток-фидеров.

8.6.49 Если это применимо: приготовление разбавлений. В BSC, добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая маркирована как “разбавления для счета клеток” и номером партии, для четырех 15-мл конических пробирок. Маркируют пробирки номером партии и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криофлакона как “дополнительные фидеры” и номером флакона (1-4).

8.6.50 Если это применимо: приготовление отсчетов клеток. Используя отдельный 3-мл шприц для каждого образца, удаляют 4×1,0 мл образца для счета клеток из транспортной упаковки суспензии клеток-фидеров, используя узел безыгольной инъекции. Аликвотируют каждый образец в криофлаконы, маркированные на Стадии 8.6.49. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции стерильным тампоном со спиртом и перемешивают суспензию клеток-фидеров между каждым отбором образцов для счета клеток.

8.6.51 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Разбавляют образцы для счета клеток посредством добавления 0,5 мл суспензии клеток в 4,5 мл среды AIM-V, маркированных номером партии и как “разбавления для счета клеток”. Это дает разбавление 1:10. Регулируют при необходимости.

8.6.52 Если это применимо: Регистрация объемов образцов для счета клеток

8.6.53 Если это применимо: определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	$8.6.52A + 8.6.52B$	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.6.52A$	D.

8.6.54 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей.

8.6.55 Если это применимо: Регистрация имени файла, жизнеспособности и отсчетов клеток согласно Nucleoview.

8.6.56 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.6.55A + 8.6.55B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.6.55C + 8.6.55D) \div 2$	F. клеток/мл

8.6.57 Если это применимо: определение верхнего и нижнего предела для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.6.56F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.6.56F \times 1,1$	H. клеток/мл

Находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах? Примечание: если любой из результатов представляет собой “Нет” осуществляют второй набор отсчетов на стадиях 8.5.59-8.5.65

8.6.59 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Примечание: разбавление может регулироваться на основе ожидаемой концентрации клеток.

8.6.60 Если это применимо: Регистрация объемов образцов отсчетов клеток. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.6.61 Если это применимо: определение коэффициента умножения.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	$8.6.60A + 8.6.60B$	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.6.60A$	D.

8.6.62 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей.

Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.6.63 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview.

8.6.64 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
жизнеспособность	$(8.6.63A + 8.6.63B) \div 2$	E. %

Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.6.63C + 8.6.63D) \div 2$	Г. клеток/мл
------------------------------------	------------------------------	--------------

8.6.65 Если это применимо: определение верхнего и нижнего предела для отсчетов

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.6.64F \times 0,9$	Г. клеток/мл
Верхний предел	$8.6.64F \times 1,1$	Н. клеток/мл

8.6.66 Если это применимо: определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.6.63 C \text{ и } D \geq 8.6.65G$	
Верхний предел	$8.6.63 C \text{ и } D \leq 8.6.65H$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой “Нет”, переходят на Стадию 8.6.67 для нахождения общего среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и продолжают вычисления.

8.6.67 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток из всех четырех полученных отсчетов.

8.6.68 Если это применимо: регулировка объема суспензии клеток-фидеров. Вычисляют установленный объем суспензии клеток-фидеров после удаления образцов для счета клеток. Общий объем клеток-фидеров со стадии 8.6.46С минус удаленные 4,0 мл.

8.6.69 Если это применимо: вычисление общего количества жизнеспособных клеток-фидеров.

Параметр	Формула	Результат
Среднее значение концентрации жизнеспособных клеток*	$8.6.56 F^*$ или $8.6.64 F^*$ или $8.6.67 E^*$	А. клеток/мл
Общий объем	$8.6.68 C$	В. мл
Общее количество жизнеспособных клеток	$A \times B$	С. клеток

* Используют отмеченную ссылку для определения концентрации жизнеспособных клеток.

8.6.70 Вычисление объема клеток-фидеров. Вычисляют объем суспензии клеток-фидеров, который требуется для получения 5×10^9 жизнеспособных клеток-фидеров.

Необходимое количество клеток-фидеров	Концентрация жизнеспособных клеток со Стадии 8.6.38А* или Стадии 8.6.69А*	Объем клеток-фидеров = 5×10^9 жизнеспособных клеток $C = A \div B$
А. 5×10^9 жизнеспособных клеток	В. клеток/мл	С. мл

*Отмеченная применимая стадия

8.6.71 Вычисление избыточного объема клеток-фидеров. Вычисляют объем избыточных клеток-фидеров для удаления. Округляют до ближайшего целого числа.

Общий объем клеток-фидеров в транспортной упаковке со Стадии 8.6.46С* или Стадии 8.6.68С*	Объем клеток-фидеров = 5×10^9 жизнеспособных клеток со Стадии 8.6.70С	Объем избыточных клеток-фидеров для удаления. Жизнеспособные клетки $C = A - B$
А. мл	В. мл	С. мл

* Отмеченная применимая стадия

8.6.72 Удаление избытка клеток-фидеров. В новый 100-мл шприц набирают 10 мл воздуха и присоединяют шприц к связке.

8.6.73 Удаление избытка клеток-фидеров. Открывают линию до транспортной упаковки “суспензия клеток-фидеров”. Используя шприц, отбирают объем клеток-фидеров, вычисленный на Стадии 8.6.71С, плюс дополнительные 10,0 мл из транспортной упаковки в 100-мл шприц. Закрывают линию до транспортной упаковки суспензии клеток-фидеров после удаления объема клеток-фидеров. Конечный шприц не удаляют. Примечание: после наполнения шприца, его заменяют новым шприцом. Можно использовать множество шприцов для удаления всего объема. С помощью каждого нового шприца, набирают 10 мл воздуха.

8.6.74 Регистрация объема. Регистрируют общий объем (включая дополнительные 10 мл) удаленных клеток-фидеров.

8.6.75 Добавление ОКТЗ. В BSC, используя 1,0-мл шприц и иглу 16G, отбирают 0,15 мл ОКТЗ.

8.6.76 Добавление ОКТЗ. Асептически удаляют иглу из шприца и присоединяют шприц к узлу безыгольной инъекции. Делают инъекцию ОКТЗ.

8.6.77 Добавление ОКТЗ. Открывают запорный кран до транспортной упаковки “суспензия клеток-фидеров” и добавляют 10 мл клеток-фидеров, удаленных на Стадии 8.6.73 для прогона ОКТЗ через линию.

8.6.78 Добавление ОКТЗ. Поворачивают шприц вверх и вниз и продавливают воздух через него для очистки линии до транспортной упаковки суспензии клеток-фидеров.

8.6.79 Добавление ОКТЗ. Оставляют оставшуюся суспензию клеток-фидеров в шприце. Закрывают все зажимы и удаляют связку из BSC.

8.6.80 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) транспортную упаковку суспензии клеток-фидеров, оставляя достаточный отрезок трубы для сварки. Утилизируют связку.

8.6.81 Обзор Секции 8.6

8.7 Заполнение и засеивание G-Rex, День 11

8.7.1 Установка G-Rex500MCS. Вне BSC, удаляют G-Rex500MCS из упаковки и осматривают колбу относительно любых трещин или дефектов трубок. Убеждаются, что все соединения Луэр-лок и покрытия являются непроницаемыми. Закрывают все зажимы на линиях G-Rex500MCS за исключением линий вентиляционного фильтра. Используя маркер, делают на линии отметку 4,5 л.

8.7.2 Удаление среды из инкубатора. Удаляют “полную среду CM2, День 11”, приготовленные на Стадии 8.4.35, из инкубатора.

8.7.3 Подготовка среды для перекачки. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию G-Rex500MCS к комплекту для переноса с насосом REPEATER, соединенному с полной средой CM2, День 11.

8.7.4 Подготовка среды для перекачки. Подвешивают мешок “полная среда CM2, День 11” на IV стойку. Проводят трубки насоса через насос Ваха.

8.7.5 Перекачивание сред в G-Rex500MCS. Настраивают насос Ваха на “Высокий” и “9”. Перекачивают 4,5 л среды в G-Rex500MCS, заполняя колбу до линии, отмеченной на Стадии 8.7.1.

8.7.6 Термическая герметизация. Термически герметизируют красную линию (согласно Примечанию к процессу 5.12) G-Rex500MCS вблизи сварного шва, созданного на Стадии 8.7.3.

8.7.7 Маркировка колб. Маркируют колбу с помощью наклейки QA образца “День 11”, получая в ходе процесса метку “День 11”.

8.7.8 Если это применимо: инкубирование колбы. Выдерживают колбу в инкубаторе, ожидая при этом засева TIL.

8.7.9 Приваривание транспортной упаковки суспензии клеток-фидеров к колбе. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию G-Rex500MCS к транспортной упаковке “суспензия клеток-фидеров”.

8.7.10 Добавление клеток-фидеров в G-Rex500MCS. Открывают все зажимы между суспензией клеток-фидеров и G-Rex500MCS и добавляют суспензию клеток-фидеров в колбу под действием силы тяжести. Убеждаются, что линия полностью очищена.

8.7.11 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) красную линию вблизи сварного шва, созданного на Стадии 8.7.9.

8.7.12 Приваривание транспортной упаковки суспензии TIL к колбе. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию G-Rex500MCS к транспортной упаковке “суспензия TIL”.

8.7.13 Добавление TIL в G-Rex500MCS. Открывают все зажимы между суспензией TIL и G-Rex500MCS и добавляют суспензию TIL в колбу под действием силы тяжести. Убеждаются, что линия полностью очищена.

8.7.14 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) красную линию вблизи сварного шва, созданного на Стадии 8.7.12, для удаления мешка с суспензией TIL.

8.7.15 Инкубирование G-Rex500MCS. Проверяют, что все зажимы на G-Rex500MCS закрыты, за исключением линии большого фильтра, и помещают в инкубатор. Параметры инкубатора: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂.

8.7.16 Вычисление окна инкубирования. Осуществляют вычисление для определения правильного времени для удаления G-Rex500MCS из инкубатора в День 16.

Время инкубирования (Стадия 8.7.15). Нижний предел: время инкубирования + 108 часов. Верхний предел: время инкубирования + 132 часов.

8.7.17 Мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

8.7.18 Подача образцов. Подача образцов на Вход.

8.7.19 Обзор Секции 8.7

8.8 Криоконсервирование избытка TIL, День 11

8.8.1 Если это применимо: заморозка избыточных флаконов с TIL. Проверяют, был ли настроен CRF до заморозки. Осуществляют криоконсервирование.

8.8.2 Если это применимо: начало CRF. Регистрируют общее количество флаконов, помещаемых в CRF (не включая пустого). Проверяют совпадает ли количество флаконов, переносимых в CRF, с общим количеством флаконов, приготовленных на Стадии 8.5.72 или Стадии 8.5.84

Стадия 8.5.72С или Стадия 8.5.84

8.8.3 Если это применимо: начало автоматизированной части профиля замораживания. Регистрируют время начала для начала автоматизированной части профиля замораживания.

8.8.4 Если это применимо: перенос флаконов из морозилки с контролируемой скоростью изменения температуры на соответствующее хранение. При завершении замораживания, перенос флаконов из CRF в соответствующий контейнер для хранения.

8.8.5 Если это применимо: перенос флаконов на соответствующее хранение. Регистрируют положение хранения в LN2.

8.8.6 Обзор Секции 8.8

8.9 Приготовление сред, День 16

8.9.1 Предварительный нагрев сред AIM-V. Удаляют три 10-л мешка для сред CTS AIM V из холодильника при 2-8°C, по меньшей мере, за 12 часов до использования и размещают ее при комнатной температуре, защищенной от света. Проверяют, не закончился ли срок годности каждого мешка. Маркируют каждый мешок с помощью номера мешка (1-3), номера партии, даты и “времени начала нагрева час/мин”. Регистрируют время и дату начала нагрева.

8.9.2 Вычисление времени нагрева среды со стадии 8.9.1. Вычисляют время нагрева мешков 1, 2 и 3 со средой. для стадии 8.9.1. Убеждаются, что все мешки нагревались в течение времени в пределах между 12 и 24 часами.

8.9.3 Проверка санитарной обработки помещения, очистки линии и материалов. Подтверждают санитарную обработку помещения, очистку линии и материалы.

8.9.4 Проверка полного выполнения списка операций предварительного процессирования.

8.9.5 Мониторинг окружающей среды. Перед предварительным процессированием, убеждаются, что был начат мониторинг окружающей среды перед процессом.

8.9.6 Установка 10-л Labtainer для супернатанта. В BSC соединяют край с большим диаметром комплекта для переноса текучих сред с насосом к одному из принимающих узлов 10-л мешка Labtainer с использованием Луэр-локов.

8.9.7 Маркировка установки 10-л Labtainer для супернатанта как “супернатант” и номером партии.

8.9.8 Установка 10-л Labtainer для супернатанта. Убеждаются, что все зажимы закрыты перед удалением из BSC. Примечание: мешок для супернатанта используется в ходе сбора TIL (Секция 8.10), который может осуществляться одновременно с приготовлением сред.

8.9.9 Оттаивание IL-2. Оттаивают $5 \times 1,1$ мл аликвоты IL-2 (6×10^6 ME/мл) (BR71424) на один мешок сред CTS AIM V пока весь лед не растает. Регистрируют номер партии и срок годности IL-2. Прикрепляют этикетки IL-2.

8.9.10 Аликвотирование GlutaMax. В BSC, аликвотируют 100,0 мл GlutaMax в приемник соответствующего размера. Регистрируют объем, добавленный в каждый приемник.

Примечание: сначала приготавливают один мешок для среды AIM-V после Стадий 8.9.10 - Стадий 8.9.28. Дополнительные необходимые мешки определяются на Стадии 8.10.59.

8.9.11 Маркировка приемников. Маркируют каждый приемник как “GlutaMax.”

8.9.12 Добавление IL-2 в GlutaMax. Используя микропипетку, добавляют 5,0 мл IL-2 в каждый приемник GlutaMax. Убеждаются в промывке наконечника согласно Примечанию к процессу 5.18 и используют новый наконечник пипетки для каждого добавляемого мл. Регистрируют объем, добавляемый в каждый приемник GlutaMax, ниже.

8.9.13 Маркировка приемников. Маркируют каждый приемник как “GlutaMax + IL-2” и номером приемника.

8.9.14 Приготовление мешка для среды CTS AIM V для препарата. Убеждаются, что 10-л мешок для сред CTS AIM V (W3012717) нагревается при комнатной температуре и защищается от света в течение 12-24 часов перед использованием. Регистрируют время окончания инкубирования на Стадии 8.9.2.

8.9.15 Приготовление мешка для сред CTS AIM V для препарата. В BSC, закрывают зажим на 4-дюймовом комплекте для переноса плазмы, затем присоединяют его к мешку, используя штырьковые узлы. Примечание: поддерживают постоянное давление, в то время как штырек поворачивается в одном направлении. Убеждаются в отсутствии проколов на боковой стороне узла.

8.9.16 Приготовление мешка для сред CTS AIM V для препарата. Соединяют край с большим диаметром комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER с 4-дюймовым комплектом для переноса плазмы через соединения Луэр-лок.

8.9.17 Установка насоса Ваха. Устанавливают насос Ваха после BSC. Удаляют секцию трубок насоса комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER из BSC и устанавливают ее в насосе REPEATER.

8.9.18 Приготовление для приготовления сред. В BSC, удаляют шприц из системы для распределения жидкости Pumpmatic (PLDS) и утилизируют. Примечание: убеждаются, что стерильность пипетки PLDS не ослабляется.

8.9.19 Приготовление для приготовления сред. Соединяют пипетку PLDS с краем меньшего диаметра комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER с помощью соединения Луэр-лок и помещают наконечник пипетки в “GlutaMax + IL-2”, приготовленный на Стадии 8.9.13, для отсоса. Открывают все зажимы между приемником и 10-л мешком.

8.9.20 Перекачивание GlutaMax +IL-2 в мешок. Настраивают скорость насоса как “средняя” и “3” и перекачивают весь “GlutaMax + IL-2” в 10-л мешок для сред CTS AIM V. Когда раствора не остается, очищают линию и останавливают насос. Регистрируют объем GlutaMax, содержащего IL-2, добавляемый в каждый мешок с Aim V, ниже. Регистрируют

8.9.21 Удаление PLDS. Убеждаются, что все зажимы закрыты, и удаляют пипетку PLDS из комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER. Удаляют установку для переноса текучих сред с насосом REPEATER и красный колпачок 4-дюймового комплекта для переноса плазмы.

8.9.22 Маркировка мешков. Маркируют каждый мешок приготовленных “полной среды CM4, День 16”.

8.9.23 Удаление сохраненных образцов сред согласно плану работы с образцами. Используя 30-мл шприц, удаляют 20,0 мл “полной среды CM4, День 16” посредством присоединения шприца к 4-дюймовому комплекту для переноса плазмы и распределяют образец в 50-мл коническую пробирку.

Примечание: удаляют только сохраненный образец среды из первого мешка приготовленных сред. Примечание: убеждаются, что 4-дюймовый комплект для переноса плазмы либо перекрывается зажимами, либо закрывается красным колпачком после удаления шприца.

8.9.24 Присоединение нового комплекта для переноса текучих сред к насосу REPEATER. Присоединяют край с большим диаметром нового комплекта для переноса текучих сред к насосу REPEATER на 4-дюймовом комплекте для переноса плазмы, которая соединена с мешком “полная среда CM4, День 16”.

8.9.25 Маркировка и хранение образца. Маркируют маркировкой согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят сохраненный образец среды при 2-8°C до подачи на Вход для исследования согласно плану работы с образцами.

8.9.26 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS осуществлен, до удаления образца.

8.9.27 Мониторинг инкубатора. Отслеживают инкубатор. Если это применимо, согласно Стадии 8.9.10, отслеживают дополнительные приготовленные мешки. Параметры инкубатора: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂.

8.9.28 Нагрев полной среды CM4, День 16. Нагревают первый мешок полной среды CM4, День 16, в инкубаторе в течение ≥ 30 минут до готовности для использования. Если это применимо, согласно Стадии 8.10.59, нагревают дополнительные мешки.

8.9.29 Приготовление разбавления. В BSC, добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которая маркирована зарегистрированным номером партии загрузки и как “разбавления для счета клеток”, в каждую из 4×15 мл конических пробирок. Маркируют конические пробирки номером партии и номером пробирки (1-4). Маркируют 4 криофлакона номером флакона (1-4). Сохраняют флаконы в BSC для использования на Стадии 8.10.31.

8.9.30 Обзор секции 8.9

8.10 Разделение REP, День 16

8.10.1 Таблица предварительного процессирования.

8.10.2 Мониторинг инкубатора. Отслеживают инкубатор. Параметры инкубатора: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, процент CO₂: $5,0 \pm 1,5\%$ CO₂

8.10.3 Удаление G-Rex500MCS из инкубатора. Осуществляют проверку, ниже, чтобы убедиться, что параметры инкубирования соответствуют, перед удалением G-Rex500MCS из инкубатора.

Нижний предел со Стадии 8.7.16B (день/месяц/год часы/минуты)	Верхний предел со Стадии 8.7.16C (день/месяц/год часы/минуты)	Время удаления из инкубатора (день/месяц/год часы/минуты)	Выполняется ли условие $8.7.16B < \text{время удаления из инкубатора} < \text{Стадия } 8.7.16C$ Да/Нет*
--	---	---	--

Удаление G-Rex500MCS из инкубатора.

8.10.4 Установка 1-л транспортной упаковки. Термически герметизируют 1-л транспортную упаковку (W3006645) согласно Примечанию к процессу 5.12, оставляя ~12 дюймов линии.

8.10.5 Приготовление 1-л транспортной упаковки. Маркируют 1-л транспортную упаковку как суспензию TIL.

8.10.6 Взвешивание 1-л транспортной упаковки. Помещают 1-л транспортную упаковку, включая всю линию на весы и регистрируют сухую массу.

8.10.7 Установка GatheRex. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию для удаления среды от G-Rex500MCS до комплекта для переноса с насосом REPEATER на 10-л мешке Labtainer “супернатант”, приготовленном на Стадии 8.9.8. Стерильно приваривают прозрачную линию для удаления клеток от G-Rex500MCS до транспортной упаковки суспензии TIL, приготовленной на Стадии 8.10.5.

8.10.8 Установка GatheRex. Помещают колбу G-Rex500MCS по левую сторону от GatheRex. Помещают мешок Labtainer для супернатант и транспортную упаковку для суспензии TIL по правую сторону.

8.10.9 Установка GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления сред из G-Rex500MCS для верхнего зажима (маркированной красной линией) и направляющих

трубок на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора от G-Rex500MCS до нижнего зажима (маркированного голубой линией) и направляющих трубок на GatheRex.

8.10.10 Установка GatheRex. Присоединяют газовую линию от GatheRex до стерильного фильтра G-Rex500 MCS. Примечание: перед удалением супернатанта из G-Rex500MCS, убеждаются, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

8.10.11 Уменьшение объема в G-Rex500MCS. Переносят ~4,5 супернатанта культуры из G-Rex500MCS в 10-л Labtainer согласно SOP-01777. Визуально проверяют колбу G-Rex500MCS, чтобы увидеть, когда уровень и среда уменьшатся до конца погружной трубы для отсоса. Примечание: если GatheRex останавливается преждевременно, его можно перезапустить, нажимая на кнопку со стрелкой, указывающей вправо.

8.10.12 Приготовление колбы для сбора TIL. После удаления супернатанта, все зажимы до красной линии закрывают.

8.10.13 Начало сбора TIL. Регистрируют время начала сбора TIL.

8.10.14 Начало сбора TIL. Энергично встряхивают колбу и взбалтывают среду для высвобождения клеток. Осуществляют осмотр колбы, чтобы убедиться, что все клетки отсоединились. Примечание: обращаются к локальному управлению, если клетки не отсоединяются.

8.10.15 Начало сбора TIL. Наклоняют колбу, чтобы убедиться, что гибкая трубка находится на краю колбы. Примечание: если трубочка для сбора клеток не находится на переходе от стенки к нижней мембране, колбу встряхивают, в то же время наклоняя ее под углом 45°, этого обычно достаточно для правильного позиционирования трубочки.

8.10.16 Сбор TIL. Открывают все зажимы, ведущие к транспортной упаковке для суспензии TIL.

8.10.17 Сбор TIL. Используя GatheRex, переносят суспензию клеток в транспортную упаковку для суспензии TIL. Примечание: убеждаются в поддержании наклонного края, пока все клетки и среды не будут собраны.

8.10.18 Сбор TIL. Осматривают мембрану относительно прилипших клеток.

8.10.19 Промывка мембраны колбы. Промывают дно G-Rex500MCS. Покрывают ~1/4 газообменной мембраны промывочными средой.

8.10.20 Закрывание зажимов на G-Rex500MCS. Убеждаются, что все зажимы на G-Rex500MCS закрыты.

8.10.21 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) транспортную упаковку, содержащую TIL, настолько близко к сварному шву, насколько это возможно, чтобы общая длина трубок оставалась приблизительно такой же.

8.10.22 Термическая герметизация. Термически герметизируют 10-л Labtainer, содержащий супернатант (согласно Примечанию к процессу 5,12), и переносят в BSC для сбора образцов на Стадии 8.10.25.

8.10.23 Вычисление объема суспензии TIL. Регистрируют массу транспортной упаковки с суспензией клеток и вычисляют объем суспензии.

8.10.24 Приготовление транспортной упаковки для удаления образца. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) 4-дюймовый комплект для переноса плазмы к транспортной упаковке для суспензии TIL со стадии 8.10.21, оставляя принимающий элемент Луэр-лока присоединенным настолько близко к мешку, насколько это возможно.

8.10.25 Удаление образцов для исследований из супернатанта клеток. В BSC, удаляют 10,0 мл супернатанта из 10-л Labtainer используя принимающий элемент Луэр-лока и шприц соответствующего размера. Помещают в 15-мл коническую пробирку и маркируют как "ВасТ". Сохраняют пробирку для образца ВасТ на Стадии 8.10.28.

8.10.26 Удаление образцов для исследования из супернатантов клеток. Используя отдельный шприц, удаляют 10,0 мл супернатанта и помещают в 15-мл коническую пробирку. Сохраняют пробирку для образца микоплазмы для использования на Стадии 8.10.32. Маркируют пробирку как "Разбавитель микоплазмы"

8.10.27 Закрывание мешка с супернатантом. Помещают красный колпачок на Луэр-лок для закрывания мешка и выносят его из BSC.

8.10.28 Отбор образцов для исследования, стерильности и ВасТ. В BSC, удаляют 1,0-мл образец из 15-мл конической пробирки, маркированной ВасТ, приготовленной на Стадии 8.10.25, используя шприц соответствующего размера и инокулируют анаэробную бутылку. Повторяют указанное выше для аэробной бутылки. Примечание: эта стадия может осуществляться вне последовательности.

8.10.29 Маркировка и хранение образцов. Маркируют маркировкой согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят образец ВасТ при комнатной температуре, защищенным от света, до подачи на Вход для исследований согласно плану работы с образцами. Примечание: не перекрывают надписями штрихкод на бутылке.

8.10.30 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS завершен, для удаления образца.

8.10.31 Удаление образцов для счета клеток. В BSC, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, удаляют 4×1,0 мл образца для счета клеток из транспортной упаковки "суспензия TIL", используя Луэр-лок. Помещают образцы в криофлаконы, приготовленные на Стадии 8.9.29.

8.10.32 Удаление образцов микоплазмы. Используя 3-мл шприц, удаляют 1,0 мл из транспортной упаковки суспензии TIL и помещают в 15-мл коническую пробирку, маркированную "Разбавитель микоплазмы", приготовленную на Стадии 8.10.26.

8.10.33 Маркировка и хранение образца. Маркируют маркировкой согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят образец микоплазмы при 2-8°C до подачи на Вход для исследований согласно плану работы с образцами.

8.10.34 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS осуществлен, до удаления образца.

8.10.35 Приготовление транспортной упаковки для засева. В BSC, присоединяют край трубки с большим диаметром комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER к Луэр-локу на транспортной упаковке, содержащей TIL. Перекрывают зажимами линию вблизи транспортной упаковки с использованием гемостата. Помещают красный колпачок на конец комплекта для переноса.

8.10.36 Помещение TIL в инкубатор. Удаляют суспензию клеток из BSC и помещают в инкубатор до необходимости. Регистрируют время.

8.10.37 Осуществление отсчетов клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Образцы для счета клеток сначала разбавляют посредством добавления 0,5 мл суспензии клеток в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленных на Стадии 8.9.29. Это дает разбавление 1:10.

8.10.38 Регистрация объемов образцов для счета клеток

8.10.39 Определение коэффициента умножения.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	$8.10.38A + 8.10.38B$	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.10.38A$	D.

8.10.40 Выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителя.

8.10.41 Регистрация имени файла, жизнеспособности и отсчеты клеток согласно Nucleoview.

8.10.42 Определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.10.41A + 8.10.41B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.10.41C + 8.10.41D) \div 2$	F. клеток/мл

8.10.43 Определение верхнего и нижнего предела для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.10.42F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.10.42F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.10.44 Определение того, находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.10.41C \text{ и } D \geq 8.10.43G$	
Верхний предел	$8.10.41 C \text{ и } D \leq 8.10.43H$	

8.10.45 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Примечание: разбавление может регулироваться на основе ожидаемой концентрации клеток.

8.10.46 Если это применимо: Регистрация объемов образцов для счета клеток. Примечание: если разбавления не требуется, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.10.47 Если это применимо: определение коэффициента умножения.

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	$8.10.46A + 8.10.46B$	C. мл
Коэффициент умножения	$C \div 8.10.46A$	D.

8.10.48 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей.

Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.10.49 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview

8.10.50 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.10.49A + 8.10.49B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.10.49C + 8.10.49D) \div 2$	F. клеток/мл

8.10.51 Если это применимо: определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.10.50F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.10.50F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.10.52 Если это применимо: определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.10.49 C \text{ и } D \geq 8.10.51G$	
Верхний предел	$8.10.49 C \text{ и } D \leq 8.10.51H$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой «Нет», переходят на Стадию 8.10.53 для определения среднего значения всех отсчетов собранных клеток.

8.10.53 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток для всех четырех полученных отсчетов.

8.10.54 Регулировка объема суспензии TIL. Вычисляют установленный объем суспензии TIL после удаления образцов для счета клеток. Общий объем клеток TIL со стадии 8.10.23C минус удаленные 5,0 мл для исследования.

8.10.55 Вычисление общего количества жизнеспособных клеток TIL.

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	$A \times B$	C. клеток

8.10.56 Вычисление колб для субкультивирования. Вычисляют общее количество колб для засева. Примечание: округляют количество колб G-Rex500MCS до ближайшего целого числа.

Общее количество отсчетов жизнеспособных клеток со стадии 8.10.55C A	Целевые клетки необходимые на одну колбу B	Количество колб G-Rex500MCS для засева $C = A \div B$
клеток	$1,0 \times 10^9$ клеток/колба	колбы

Примечание: максимальное количество колбы G-Rex500MCS для засева равно пяти. Если вычисленное количество колб для засева больше пяти, засевают только пять колб с использованием всего доступного объема суспензии клеток

8.10.57 Вычисление количества колб для субкультивирования

Критерии	Да/Нет
Количество колб G-Rex500MCS для засева на Стадии 8.10.56C ≤ 5 Если да, количество засеваемых колб вычисляется на Стадии 8.10.58.	
Количество колб G-Rex500MCS для засева на Стадии 8.10.56C > 5 Если да, засевают 5 колб всеми доступными клетками.	

8.10.58 QA Обзор вычислений получаемых отсчетов клеток на стадиях 8.10.38-8.10.57.

8.10.59 Определение количества необходимых дополнительных мешков для среды. Вычисляют количество мешков для сред, необходимых в дополнение к мешку, приготовленному на Стадии 8.9.28.

Количество колб G-Rex500MCS для засева (Стадия 8.10.56C) A	Необходимое количество мешков для сред $B = A \div 2^*$	Количество мешков, приготовленных на Стадии 8.9.22 C	Количество дополнительных мешков для приготовления $D = B - C$
		1	

*Округляют необходимое количество мешков для сред до следующего целого числа.

8.10.60 Если это применимо: приготовление дополнительных сред. Приготавливают один 10-л мешок “Среды CM4, День 16” для каждой двух необходимых колб G-Rex-500M, вычисленных на Стадии 8.10.59D. Переходят на Стадию 8.10.62 и засевают первую колбу (колбы) GREX-500M, в то время как дополнительные среды приготавливаются и нагреваются.

8.10.61 Если это применимо: приготовление дополнительных мешков для среды. Приготавливают и нагревают вычисленное количество дополнительных мешков для сред, определенное на Стадии 8.10.59D, повторяя Стадию 8.9.10 - Стадию 8.9.28.

8.10.62 Заполнение G-Rex500MCS. Открывают G-Rex500MCS на стеллаже и осматривают относительно трещин в емкости или дефектов в трубах. Убеждаются, что все соединения и оболочки Луэра являются герметичными. Делают отметку на линии 4500 мл снаружи колбы маркером. Закрывают все зажимы на G-Rex500MCS, за исключением линии большого фильтра.

8.10.63 Заполнение G-Rex500MCS. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию для среды G-Rex500MCS к комплекту для переноса текучих сред на мешке для среды, приготовленном на Стадии 8.9.28.

8.10.64 Подготовка среды для перекачки. Подвешивают “Среда CM4, День 16” на стойке IV. Проводят трубки насоса через насос Ваха.

8.10.65 Перекачивают среды в G-Rex500MCS. Настраивают насос Ваха на “Высокое” и “9” и перекачивают 4500 мл среды в колбу. Перекачивают 4,5 л “Среды CM4, День 16” в G-Rex500MCS, заполняя до линии, отмеченной на колбе на Стадии 8.10.62. После переноса 4,5 л среды, насос останавливают.

8.10.66 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) красную линию для сред G-Rex500MCS, вблизи сварного шва, созданного на Стадии 8.10.63, удаляют мешок для среды.

8.10.67 Повторное заполнение. Повторяют Стадии 8.10.62-8.10.66 для каждой колбы, вычисленной на Стадии 8.10.56C, когда среда нагревается и приготавливаются к использованию.

Примечание: можно наполнять множество колб одновременно, используя наполнение под действием силы тяжести или множество насосов. Примечание: заполняют только две колбы на один мешок среды.

8.10.68 Регистрация и маркировка заполненной колбы (колб). Маркируют каждую колбу по алфавиту, когда она заполняется, получаемыми QA обрабатываемыми метками “День 16”.

8.10.69 Маркировка образца. Прикрепляют к образцу метку "День 16" ниже.

8.10.70 Если это применимо: инкубирование колбы. Выдерживают колбу в инкубаторе, ожидая при этом засева TIL.

8.10.71 Проверка количества заполненных колб. Регистрируют общее количество заполненных колб.

8.10.72 Вычисление добавляемого объема суспензии клеток. Вычисляют целевой объем суспензии TIL, добавляемой в новые колбы G-Rex500MCS.

Общий объем суспензии TIL со стадии 8.10.54C A	Количество заполняемых колб со Стадии 8.10.71	Целевой объем суспензии клеток для переноса в каждую колбу $C = A \div B$
мл		мл

Если 8.10.56C больше пяти, будут засеваться только пять колб, используя весь объем суспензии клеток

8.10.73 Приготовление колб для засева. Удаляют G-Rex500MCS со стадии 8.10.70 из инкубатора.

8.10.74 Приготовление для перекачки. Закрывают все зажимы на G-Rex500MCS за исключением линии большого фильтра. Проводят трубки насоса через насос Ваха.

8.10.75 Удаление TIL из инкубатора. Удаляют транспортную упаковку “суспензия TIL” из инкубатора и регистрируют конечное время инкубирования на Стадии 8.10.36.

8.10.76 Приготовление суспензии клеток для засева. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) транспортную упаковку “суспензия ТП” со стадии 8.10.75 к входной линии насоса.

8.10.77 Тарирование весов. Помещают мешок с суспензией ТП на весы. Заливают линию от мешка с суспензией ТП до сварного шва, используя насос Ваха, настроенный на “Низкое” и “2”. Тарируют весы.

8.10.78 Засевание колбы суспензией ТП. Настраивают насос Ваха на “среднее” и “5”. Перекачивают объем суспензия ТП, вычисленный на Стадии 8.10.72С, в колбу. Регистрируют объем суспензии ТП, добавленный в каждую колбу.

8.10.79 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) транспортную упаковку “суспензия ТП”, оставляя достаточную длину трубки для приваривания к следующей колбе. Используют экстрактор линии для очистки от остаточной суспензии ТП в линии колбы G-Rex, ведущей в емкость.

8.10.80 Заполнение оставшихся колб. Перед засеиванием каждой колбы убеждаются в перемешивании транспортной упаковки “суспензия ТП” и повторяют Стадии 8.10.76-8.10.79 для засеивания всех оставшихся колб. Заполняют колбу (колбы) в алфавитном порядке.

8.10.81 Мониторинг инкубатора. Примечание: если колбы должны разделяться для двух инкубаторов, убеждаются, что отслеживаются оба. Параметры инкубатора: температура на дисплее LED: $37,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$, процент CO_2 : $5,0 \pm 1,5 \% \text{CO}_2$.

8.10.82 Инкубирование колб. Регистрируют время помещения каждой колбы в инкубатор.

8.10.83 Вычисление окна инкубирования. Осуществляют вычисления ниже для определения диапазона времени для удаления G-Rex500MCS из инкубатора в День 22.

Колба	8.10.83А Время инкубирования (Стадия 8.10.82) (день/месяц/год часы/минуты)	8.10.83В Нижний предел: время инкубирования + 132 часов (день/месяц/год часы/минуты)	8.10.83С Верхний предел: время инкубирования + 156 часов (день/месяц/год часы/минуты)
-------	--	--	---

8.10.84 Мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

8.10.85 Подача образца. Убеждаются, что все Образцы, День 16, подаются на Вход.

8.10.86 Обзор секции 8.10.

8.11 Приготовление промывочного буфера, День 22

8.11.1 Проверка санитарной обработки помещения, очистки линии и материалов.

8.11.2 Проверка полного выполнения списка операций предварительного процессирования.

8.11.3 Мониторинг окружающей среды. Перед предварительным процессированием, убеждаются, что осуществляется мониторинг окружающей среды перед процессом.

8.11.4 Приготовление 10-л мешка Labtainer. В BSC, присоединяют 4-дюймовый комплект для переноса плазмы к 10-л мешку Labtainer с помощью соединения Луэр-лок.

8.11.5 Приготовление 10-л мешка Labtainer. Маркируют как “Супернатант”, номером партии и временем начала/датой.

8.11.6 Приготовление 10-л мешка Labtainer. Закрывают все зажимы перед переносом из BSC. Примечание: приготавливают один 10-л мешок Labtainer для каждой двух колб G-Rex500MCS для сбора. Примечание: мешок (мешки) для супернатанта используют в Секции 8.12., которую можно осуществлять одновременно с Секцией 8.11.

8.11.7 Приваривание комплекта для переноса текучих сред. Вне BSC, закрывают все зажимы на 4S-4M60. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) комплект для переноса текучих сред с насосом REPEATER к одному из принимающих краев соединения Луэр-лок 4S-4M60.

8.11.8 Перенос материалов в BSC. Переносят Plasmalyte-A и 25% альбумин человека в BSC. Переносят сборку 4S-4M60 и комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER в BSC.

Описание компонента	Необходимое количество
Plasmalyte-A	3000,0 мл
25% Альбумин человека	120,0 мл
4S-4M60 с комплектом для переноса текучих сред с насосом REPEATER	1 Устройство Стадия 8.11.7

8.11.9 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Соединяют штырьками три мешка Plasmalyte-A с набором коннекторов 4S-4M60. Примечание: протирают покрытие узла тампоном со спиртом (W3009488) перед удалением. Примечание: поддерживают постоянное давление, в то время как штырек поворачивается в одном направлении. Убеждаются в отсутствии проколов на боковой стороне узла.

8.11.10 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Соединяют 3000-мл мешок для сбора Origen с помощью соединения Луэр-лок с краем большего диаметра комплекта для переноса с насосом REPEATER.

8.11.11 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Закрывают зажимы на неиспользуемых линиях 3000-мл мешка Origen.

8.11.12 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Устанавливают насос Ваха после BSC. Проводят трубки установки переноса через насос Ваха, расположенный вне BSC. Настраивают насос на “Высокое” и “9”.

8.11.13 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Открывают все зажимы от Plasmalyte-A до 3000-мл мешка Origen.

8.11.14 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Перекачивают весь Plasmalyte-A в 3000-мл мешок Origen. После переноса всего Plasmalyte-A, насос останавливают.

8.11.15 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. При необходимости удаляют воздух из 3000-мл мешка Origen, изменяя направление насоса на обратное и манипулируя положением мешка.

8.11.16 Перекачка Plasmalyte в 3000-мл мешок. Закрывают все зажимы. Удаляют 3000-мл мешок из комплекта для переноса текучих сред с насосом REPEATER с помощью соединения Луэр-лок и помещают красный колпачок (W3012845) на линию до мешка.

8.11.17 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Открывают вентиляционный мини-штырек. Без ослабления стерильности штырька, убеждаются что голубой колпачок закреплен надежно.

8.11.18 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Соединяют штырьками мембрану бутылки с 25% альбумином человека с помощью вентиляционного мини-штырька. Примечание: убеждаются, что стерильность штырька не ослабляется.

8.11.19 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Повторяют Стадию 8.11.17 - Стадию 8.11.18 два раза для трех (3) соединенных штырьками бутылок с 25% альбумином человека, в целом.

8.11.20 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Удаляют голубой колпачок с одного вентиляционного мини-штырька и присоединяют 60-мл шприц к бутылке с 25% сывороточным альбумином человека.

8.11.21 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Отбирают 60 мл 25% сывороточного альбумина человека. Примечание: может потребоваться использование нескольких бутылок с 25% сывороточным альбумином человека. При необходимости, отсоединяют шприц вентиляционного мини-штырька и присоединяют его к следующему вентиляционному мини-штырьку в бутылке с 25% сывороточным альбумином человека. Вентиляционный мини-штырек не удаляют из бутылки с 25% сывороточным альбумином человека.

8.11.22 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. После получения 60 мл, удаляют шприц вентиляционного мини-штырька.

8.11.23 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Присоединяют шприц к узлу безыгольной инъекции на 3000-мл мешке Origen, заполненном Plasmalyte-A на Стадии 8.11.16. Распределяют весь 25% альбумин человека. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции тампоном со спиртом перед каждым использованием.

8.11.24 Добавление 25% альбумина человека в 3000-мл мешок. Повторяют Стадию 8.11.20 - Стадию 8.11.23 до получения конечного объема 120,0 мл 25% альбумина человека.

8.11.25 Перемешивание содержимого мешка. Осторожно перемешивают содержимое мешка после добавления всего 25% альбумина человека.

8.11.26 Маркировка мешка. Маркируют как “промывочный буфер LOVO” и номером партии, и присваивают 24-часовой срок годности.

8.11.27 Приготовление разбавителя IL-2. Используя 10-мл шприц, удаляют 5,0 мл промывочного буфера LOVO, с использованием узла безыгольной инъекции на мешке с промывочным буфером LOVO. Распределяют промывочный буфер LOVO в 50-мл коническую пробирку и маркируют как “Разбавитель IL-2” и номером партии. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции тампоном со спиртом перед каждым использованием.

8.11.28 Аликвотирование промывочного буфера LOVO в пустой мешок CRF. Используя 100-мл шприц, отбирают 70,0 мл промывочного буфера LOVO из узла безыгольной инъекции. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции тампоном со спиртом перед каждым использованием.

8.11.29 Аликвотирование промывочного буфера LOVO в пустой мешок CRF. Помещают красный колпачок на шприц и маркируют как “пустой криомешок” и номером партии. Примечание: шприц выдерживают при комнатной температуре до использования на Стадии 8.14.3

8.11.30 Окончание приготовления промывочного буфера. Закрывают все зажимы на мешке с промывочным буфером LOVO.

8.11.31 Оттаивание IL-2. Оттаивают 1,1 мл IL-2 (6×10^6 МЕ/мл), пока весь лед не растает. Регистрируют номер партии и срок годности IL-2. Примечание: убеждаются, что прикреплена этикетка IL-2.

8.11.32 Приготовление IL-2. Добавляют 50 мкл исходного раствора IL-2 (6×10^6 МЕ/мл) в 50-мл коническую пробирку, маркированную как “Разбавитель IL-2”.

8.11.33 Приготовление IL-2. Повторно маркируют коническую пробирку как “ 6×10^4 IL-2”, датой, номером партии и 24 -часовым сроком годности. Покрывают и хранят при 2-8°C.

8.11.34 Стадия криоконсервирования. Размещают 5 криокассет при 2-8°C для их предварительного кондиционирования с целью конечного криоконсервирования продукта.

8.11.35 Приготовление разбавлений для счета клеток. В BSC, добавляют 4,5 мл среды AIM-V, которую маркируют номером партии и как “разбавления для счета клеток”, в 4 отдельных 15-мл конических пробирках. Маркируют пробирки зарегистрированным номером партии загрузки и номером пробирки (1-4). Откладывают в сторону для использования на Стадии 8.12.34

8.11.36 Приготовление отсчетов клеток. Маркируют 4 криофлакона номером флакона (1-4). Выдерживают флаконы в BSC для использования на Стадии 8.12.33.

8.11.37 Обзор секции 8.11

8.12 Сбор TIL, День 22

8.12.1 Мониторинг инкубатора. Отслеживают инкубатор. Параметры инкубатора температура на дисплее LED: $37 \pm 2,0^\circ\text{C}$, процент CO₂: $5\% \pm 1,5\%$. Примечание: Секция 8.12 может осуществляться одновременно с Секцией 8.11.

8.12.2 Удаление колб G-Rex500MCS из инкубатора. Осуществляют проверку ниже, чтобы убедиться, что параметры инкубирования соответствуют, перед удалением G-Rex500MCS из инкубатора.

Колба	Полка	Нижний предел со стадии 8.10.83 В	Верхний предел со стадии 8.10.83 С (день/месяц/год часы/минуты)	Время удаления из инкубатора (день/месяц/год часы/минуты)	Проверяют выполнение условия 8.10.83 В < время удаления из инкубатора < Стадия 8.10.83 С Да/Нет*
-------	-------	-----------------------------------	---	---	--

Примечание: эта стадия должна осуществляться, когда каждая колба удаляется из инкубатора.

8.12.3 Приготовление мешка для сбора TIL. Маркируют 3000-мл мешок для сбора как “суспензия TIL”, номером партии и временем начала/датой.

8.12.4 Герметизация дополнительных соединений. Термически разгерметизируют два соединения Луэр-лок на мешке для сбора вблизи края каждого соединения согласно Примечанию к процессу 5.12.

8.12.5 Установка GatheRex. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) красную линию для удаления среды от G-Rex500MCS к 10-л мешку Labtainer, приготовленному на Стадии 8.11.5. Примечание: сошлемся на Примечание к процессу 5.16 относительно использования множества устройств GatheRex.

8.12.6 Установка GatheRex. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) прозрачную линию для удаления клеток от G-Rex500MCS к мешку для сбора суспензии TIL, приготовленному на Стадии 8.12.3. Примечание: сошлемся на Примечание к процессу 5.16 относительно использования множества устройств GatheRex.

8.12.7 Установка GatheRex. Помещают колбу G-Rex500MCS по левую сторону от GatheRex. Помещают мешок для супернатанта Labtainer и мешок для сбора набранной суспензии TIL по правую сторону от него.

8.12.8 Установка GatheRex. Устанавливают красную линию для удаления среды от G-Rex500MCS до верхнего зажима (маркированного красной линией) и направляющих трубок на GatheRex. Устанавливают прозрачную линию для сбора от G-Rex500MCS до нижнего зажима (маркированной голубой линией) и направляющих трубок на GatheRex.

8.12.9 Установка GatheRex. Присоединяют газовую линию от GatheRex до стерильного фильтра G-Rex500MCS. Примечание: перед удалением супернатанта из G-Rex500MCS, убеждаются, что все зажимы на линиях для удаления клеток закрыты.

8.12.10 Уменьшение объема. Переносят ~4,5 л супернатанта из G-Rex500MCS в мешок для супернатанта. Визуально осматривают колбу G-Rex500MCS, чтобы увидеть, когда уровень и среда уменьшатся до конца погружной трубы для отсоса. При необходимости повторяют стадию. Примечание: если GatheRex останавливается преждевременно, его можно перезапустить, нажимая на кнопку со стрелкой, указывающей вправо, показывающей возобновление работы.

8.12.11 Приготовление колбы для сбора TIL. После удаления супернатанта, закрывают все зажимы для красной линии.

8.12.12 Начало сбора TIL. Регистрируют время начала сбор TIL.

8.12.13 Начало сбора TIL. Энергично встряхивают колбу и взбалтывают среды для высвобождения клеток. Осуществляют осмотр колбы, чтобы убедиться, что все клетки отсоединились. Помещают 3000-мл мешок для сбора “суспензии TIL” на сухие салфетки на плоской поверхности. Примечание: обращаются к локальному управлению, если клетки не отсоединяются.

8.12.14 Начало сбора ТП. Наклоняют колбу, чтобы убедиться, что гибкая трубка находится на краю колбы. Примечание: если гибкая трубка для сбора клеток не находится на переходе от стенки к нижней мембране, колбу встряхивают, когда она наклонена под углом 45°, этого обычно достаточно для правильного позиционирования гибкой трубки.

8.12.15 Сбор ТП. Открывают все зажимы, ведущие к мешку для сбора суспензии ТП.

8.12.16 Сбор ТП. Используют GatheRex, переносят суспензию ТП в 3000-мл мешок для сбора. Примечание: поддерживают край наклоненным пока не соберут все клетки и среду.

8.12.17 Сбор ТП. Проверяют мембрану относительно прилипших клеток.

8.12.18 Промывка мембраны колбы. Промывают дно G-Rex500MCS. Покрывают ~1/4 газообменной мембраны средой для промывки.

8.12.19 Закрывание зажимов на G-Rex500MCS. Убеждаются, что все зажимы закрыты.

8.12.20 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) мешок для сбора, содержащий ТП, настолько близко к сварному шву, насколько это возможно, так что общая длина трубок остается приблизительно такой же.

8.12.21 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) мешок с супернатантом.

8.12.22 Завершение сбора оставшихся колб G-Rex 500 MCS. Повторяют Стадии 8.12.2 и 8.12.5-8.12.21, собирая все ТП в один мешок для сбора.

Примечание: необходимо заменять 10-л мешок для супернатанта через каждые 2 колбы. Примечание: сошлемся на Примечание к процессу 5.16 относительно использования множества устройств GatheRex.

8.12.23 Приготовление исходного мешка LOVO. Получают новый 3000-мл мешок для сбора. Маркируют как “исходный мешок LOVO”, номером партии и временем начала/датой.

8.12.24 Приготовление исходного мешка LOVO. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) трубки на “исходном мешке LOVO”, удаляя принимающие элементы соединения Луэр-лок, оставляя достаточную длину линии до сварного шва.

8.12.25 Взвешивание исходного мешка LOVO. Помещают пластиковый резервуар соответствующего размера на весы и тарируют. Помещают исходный мешок LOVO, включая узлы и линии, в резервуар и регистрируют сухую массу.

8.12.26 Перенос суспензии клеток в исходный мешок LOVO. Закрывают все зажимы 170 мкм гравитационного фильтра для крови.

8.12.27 Перенос суспензии клеток в исходный мешок LOVO. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) длинный конечный край гравитационного фильтра для крови к исходному мешку LOVO.

8.12.28 Перенос суспензии клеток в исходный мешок LOVO. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) одну из двух исходных линий фильтра к мешку для сбора “суспензии собранных TIL”.

8.12.29 Перенос суспензии клеток в исходных мешок LOVO. После завершения сварки, термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) неиспользуемую линию на фильтре для ее удаления.

8.12.30 Перенос суспензии клеток в исходный мешок LOVO. Открывают все необходимые зажимы и поднимают суспензию TIL посредством подвешивания мешка для сбора на IV стойке для начала переноса в гравитационном потоке TIL сквозь фильтр для крови и в исходный мешок LOVO. Осторожно вращают или мнут мешок для суспензии TIL при опорожнении для поддержания однородной суспензии TIL.

Примечание: не позволяют исходному мешку LOVO свисать с устройства для фильтрации. Выкладывают исходный мешок LOVO на сухие салфетки на плоской поверхности.

8.12.31 Закрывание всех зажимов. После переноса всех TIL в исходный мешок LOVO, закрывают все зажимы.

8.12.32 Термическая герметизация. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) настолько близко к сварному шву, насколько это возможно для удаления гравитационного фильтра для крови.

8.12.33 Удаление образцов для счета клеток. В BSC, используя отдельные 3-мл шприцы для каждого образца, удаляют 4×1,0 мл образца для счета клеток из исходного мешка LOVO, используя узел для безыгольной инъекции. Помещают образцы в криофлаконы, приготовленные на Стадии 8.11.36. Примечание: протирают узел безыгольной инъекции тампоном со спиртом и перемешивают содержимое исходного мешка LOVO между каждым отбором образца.

8.12.34 Осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Разбавляют образцы для счета клеток, сначала, посредством добавления 0,5 мл суспензии клеток в 4,5 мл среды AIM-V, приготовленной на Стадии 8.11.35. Это дает разбавления 1:10.

8.12.35 Регистрация объемов образцов для счета клеток.

8.12.36 Определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образца для счета клеток	8.12.35A + 8.12.35B	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.12.35A$	D.

8.12.37 Выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителя. Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.12.38 Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview

8.12.39 Определение средней жизнеспособности, концентрации жизнеспособных клеток, и общей концентрации ядросодержащих клеток осуществляемого счета клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.12.38A + 8.12.38B) \div 2$	G.
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.12.38C + 8.12.38D) \div 2$	H. клеток/мл
Общая концентрация ядросодержащих клеток	$(8.12.38E + 8.12.38F) \div 2$	I. клеток/мл

8.12.40 Определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.12.39H \times 0,9$	J. клеток/мл
Верхний предел	$8.12.39I \times 1,1$	K. клеток/мл

8.12.41 Определение того, находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.12.38 C \text{ и } D \geq 8.12.40J$	
Верхний предел	$8.12.38 C \text{ и } D \leq 8.12.40K$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой “Нет”, осуществляют второй набор отсчетов на Стадиях 8.12.42-8.12.49.

8.12.42 Если это применимо: осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 и Примечания к процессу 5.14. Примечание: разбавление может регулироваться на основе ожидаемой концентрации клеток.

8.12.43 Если это применимо: Регистрация объемов образцов для счета клеток

8.12.44 Если это применимо: определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	$8.12.43A + 8.12.43B$	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.12.43A$	D.

8.12.45 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, введены все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей.

Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.12.46 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview

8.12.47 Если это применимо: определение средней жизнеспособности, концентрации жизнеспособных клеток и общей концентрации ядросодержащих клеток для осуществляемого счета клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.12.46A + 8.12.46B) \div 2$	G.
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.12.46C + 8.12.46D) \div 2$	H. клеток/мл
Общая концентрация ядросодержащих клеток	$(8.12.46E + 8.12.46F) \div 2$	I. клеток/мл

8.12.48 Если это применимо: определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	8.12.47 $H \times 0,9$	J. клеток/мл
Верхний предел	8.12.47 $H \times 1,1$	K. клеток/мл

8.12.49 Если это применимо: определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	8.12.46 C и $D \geq 8.12.48J$	
Верхний предел	8.12.46 C и $D \leq 8.12.48K$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой “Нет”, переходят на Стадию 8.12.50 для определения среднего значения.

8.12.50 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и среднего значения общей концентрации ядродержащих клеток по всем четырем, полученным отсчетам.

8.12.51 QA Обзор отсчетов клеток. QA обзорные вычисления персонала, осуществляемые на Стадиях 8.12.38-8.12.50.

8.12.52 Взвешивание исходного мешка LOVO. Помещают пластиковый резервуар соответствующего размера на весы и тарируют. Помещают полный исходный мешок LOVO в резервуар и регистрируют массу. Вычисляют объем суспензии клеток.

8.12.53 Вычисление общего количества жизнеспособных клеток TPL.

Параметр	Формула	Результат
Среднее значение концентрации 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	$A \times B$	C. клеток
Выполняется ли условие $C \geq 1,5 \square 10^9$	Да/Нет**	

*Отмеченную ссылку на стадию используют для определения концентрации жизнеспособных клеток.

**Если “Да,” продолжают. Если “Нет” обращаются к локальному управлению.

8.12.54 Вычисление общего количества ядродержащих клеток.

Параметр	Формула	Результат
Среднее значение общей концентрации ядродержащих 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 ядродержащих клеток	$A \times B$	C. клеток

*Отмеченную ссылку на стадию используют для определения общей концентрации ядросодержащих клеток.

8.12.55 Приготовление разбавителя для микоплазмы. В BSC, удаляют 10,0 мл из одного мешка для супернатанта через узел Луэра для отбора образцов и помещают в 15-мл коническую пробирку. Маркируют 15-мл коническую пробирку “Разбавитель микоплазмы” и выдерживают в BSC для использования на Стадии 8.14.69.

8.12.56 Обзор Секции 8.12

8.13 LOVO

8.13.1 Включают LOVO, используя переключатель слева сзади инструмента. Примечание: Стадии 8.13.1-8.13.13 могут осуществляться одновременно с Секциями 8.11-8.12.

8.13.2 Проверка чашки весов и датчика давления.

8.13.3 Убеждаются, что нет ничего свисающего на любой из чашек весов и проверяют данные для каждой весов. Регистрируют значения на Стадии 8.13.5. Примечание: если любой из результатов весов находится вне диапазона 0 +/- 2 г, осуществляют калибровку чашек весов.

8.13.4 Если все весы находятся в пределах допуска без свешивающейся массы переходит к подвешиванию 1 кг масс на каждой весах (#1-4) и проверяют данные. Регистрируют значения на Стадии 8.13.5.

8.13.5 Проверка весов. Регистрируют показываемые значения для каждой весов. Если значения находятся в допустимых пределах, продолжают процессирование. Если значения не соответствуют этим пределам, осуществляют калибровку.

8.13.6 Проверка данных датчика давления на дисплее профиля работы инструмента и их регистрация. Приемлемый диапазон для данных давления составляет 0 +/- 10 мм. рт. ст. Если отображаемое значение находится вне этого диапазона, сохраняют новые настройки атмосферного давления согласно инструкциям устройства.

8.13.7 Повторение стадий. Если осуществляется новая калибровка чашек весов или сохраняются новые настройки атмосферного давления, повторяют Стадии 8.13.3-8.13.6.

8.13.8 Начало протокола “Сбор TIL в G-Rex” из выпадающего меню.

8.13.9 Отображение экрана Раствор 1: данные типа буфера PlasmaLyte

8.13.10-8.13.16 Следуют указаниям сенсорного дисплея LOVO.

8.13.17 Определение целевого объема конечного продукта.

Примечание: используя значение общего количества ядросодержащих клеток (TNC) со стадии 8.12.54 С и таблицу ниже, определяют целевой объем конечного продукта. Регистрируют объем конечного продукта (мл)

Диапазон клеток	Целевой объем конечного продукта (Ретентата) (мл)
$0 < \text{общее количество (жизнеспособных + погибших) клеток} \leq 7,1 \times 10^{10}$	165

$7,1 \times 10^{10} < \text{общее количество (жизнеспособных + погибших) клеток} \leq 1,1 \times 10^{11}$	215
$1,1 \times 10^{11} < \text{общее количество (жизнеспособных + погибших) клеток} \leq 1,5 \times 10^{11}$	265

Примечание: если TVC со стадии 8.12.53 $C > 1,5 \times 10^{11}$, обращаются к локальному управлению.

8.13.18-8.13.22 Следуют указаниям сенсорного дисплея LOVO.

8.13.23 Загрузка одноразового набора. Перед загрузкой одноразового набора, протирают узел датчика давления салфеткой со спиртом, а затем безворсовой салфеткой. Загружают одноразовый набор. Следуют инструкциям дисплея по загрузке одноразового набора.

8.13.24 Удаление мешка с фильтратом. Когда стандартный одноразовый набор LOVO загружается, нажимают кнопку Следующий. Отображается информация о контейнере и экран Положение. Удаляют мешок с фильтратом с весов.

8.13.25 Проверка того, что контейнер для фильтрата новый и зашкаленный

8.13.26 Введение емкости фильтрата. Стерильно наваривают вспомогательный мешок LOVO на линию с входящим элементом Луэр-лока имеющегося мешка с фильтратом. Убеждаются, что все зажимы открыты и путь для текучей среды свободен. Нажимают поле ввода емкости контейнера для фильтрата. Появляется численная клавиатура. Вводят общую новую емкость фильтрата (5000 мл). Нажимают на кнопку для одобрения ввода. Примечание: оцениваемый объем фильтрата не должен превышать 5000 мл.

8.13.27 Установка контейнера с фильтратом на стеллаже. Примечание: если трубка удаляется из зажима F в ходе сварки, помещают трубку обратно в зажим. Помещают новый контейнер с фильтратом на стеллаж. Мешок с фильтратом не подвешивается на чашке весов #3. Чашка весов #3 будет пустой в ходе процедуры.

8.13.28 Следуют указаниям сенсорного дисплея LOVO после изменений относительно контейнера с фильтратом.

8.13.29 Проверка того, загрузился ли набор правильно. Отображается общий вид сухой проверки одноразового набора. Проверяют, загрузился ли набор правильно и все ли зажимы открыты. Проверяют все трубки на дефекты или другие забивания и проверяют по возможности. Убеждаются что набор правильно установлен и проверяют все зажимы Robert. Нажимают кнопку Да. Все механические зажимы LOVO закрываются автоматически и отображается дисплей проверки установки одноразового набора. LOVO проходит через ряд стадий повышения давления для проверки набора.

8.13.30 Результаты проверки набора. Если набор проходит проверку, переходят на следующую стадию. *Если Нет, можно осуществить вторую проверку набора после окончания проверок. *Если Нет, проверяют все трубки относительно дефектов или других забивания и исправляют. *Если Нет, убеждаются, что набор установлен правильно и проверяют все зажимы Robert. Если 2-ая проверка набора неудачная: обращаются к

локальному управлению и приготавливаются к установке нового набора в Секции 10.0. Повторяют Стадию 8.13.23-Стадию 8.13.30 при необходимости.

8.13.31 Присоединение PlasmaLyte. Отображается экран соединения растворов. Величина промывки всегда должна быть 3000 мл. Вводят это значение на экран.

Стерильно приваривают 3000-мл мешок PlasmaLyte к трубкам, проходящим через зажим 1, согласно Примечанию к процессу 5.11. Подвешивают мешок PlasmaLyte на IV стойку, помещая обе угловых петли мешка на крючок.

8.13.32 Проверка присоединения PlasmaLyte. Открывают любые пластиковые зажимы. Проверяют, соответствует ли пункт Объем раствора 3000 мл. Нажимают на кнопку “Далее”. Отображается общий вид начального периода для одноразового набора. Проверяют, что PlasmaLyte прикреплен и что любые сварные швы и пластиковые зажимы на трубках, ведущих к мешку PlasmaLyte, открыты, затем нажимают на кнопку Да.

8.13.33 Наблюдение движения PlasmaLyte. Начинается начальный период для одноразового набора и отображается экран начального периода одноразового набора. Визуально наблюдают, что PlasmaLyte движется по трубкам, соединяющимся с мешком PlasmaLyte.

Если текучая среда не движется, нажимают кнопку пауза на дисплее и определяют, закрыт ли по-прежнему зажим или сварной шов. После того, как проблема решена, нажимают кнопку Возобновить на дисплее для возобновления начального периода для одноразового набора. Когда начальный период для одноразового набора успешно заканчивается, отображается экран Присоединение Источника.

8.13.34-8.13.35 Следуют указаниям сенсорного дисплея LOVO.

8.13.36 Присоединение исходного контейнера к трубкам. Стерильно приваривают исходный мешок LOVO, приготовленный на Стадии 8.12.31, к трубке, проходящей через Зажим S, согласно Примечанию к процессу 5.11. Может появиться необходимость в удалении трубки из зажима. Примечание: убеждаются в замене исходной трубки в защелке S, если ее удаляют.

8.13.37 Подвешивание исходного контейнера. Подвешивают исходный контейнер на стойку IV, помещая обе угловых петли мешка на крюк. Источник не подвешивается на чашке весов #1. Открывают все зажимы на пути к исходному мешку.

8.13.38 Проверка присоединения исходного контейнера. Нажимают на кнопку Далее. Отображается общий вид начального периода источника. Проверяют, что источник присоединен к одноразовому набору, и что любые сварные швы и пластиковые зажимы на трубках, ведущих к Источнику, открыты. Нажимают кнопку Да.

8.13.39 Подтверждают движение PlasmaLyte. Начинается начальный период источника и отображается экран начального периода источника. Визуально наблюдают, что PlasmaLyte движется по трубке, присоединенной к исходному мешку. Если текучая среда не движется, нажимают кнопку пауза на дисплее и определяют, закрыты ли по-прежнему зажим или сварной шов. После решения проблемы, нажимают кнопку Возобновить на дисплее для возобновления начального периода источника.

8.13.40 Экран начало процедуры. Когда начальный период источника успешно заканчивается, отображается Экран Начало процедуры. Когда нажимают на Старт, экран паузы “Цикл 1 предварительной промывки” появляется непосредственно после нажатия кнопки Старт.

8.13.41 Инвертирование обрабатываемого мешка. Удаляют обрабатываемый мешок с чашки весов #2 (можно также удалить трубки из направляющих трубок верхнего обрабатываемого узла) и вручную инвертируют его, делая возможным добавление промывочного буфера в ходе стадии начального периода одноразового набора чтобы он покрыл все внутренние поверхности мешка. Повторно подвешивают обрабатываемый мешок на чашке весов #2 (этикетка на мешке должна быть направлена влево). Заменяют трубки верхнего узла в направляющих трубок, если их удаляют.

8.13.42 Инвертирование исходного мешка. Перед нажатием кнопки Старт, перемешивают содержимое исходного мешка без удаления его со стойки IV, массируя углы мешка и осторожно перемешивая клетки для получения гомогенной суспензии клеток. Нажимают кнопку Возобновить. LOVO начинает процессирование текучей среды из исходного мешка и отображается экран Цикл промывки 1.

8.13.43 Пауза для промывки исходного мешка. Экран Пауза для промывки исходного мешка отображается после того, как исходный контейнер опорожняется и LOVO добавляет промывочный буфер в исходный мешок. Без удаления исходного мешка со стойки IV, массируют углы и перемешивают как следует. Нажимают кнопку Возобновить.

8.13.44 Пауза для перемешивания обрабатываемого мешка. Для приготовления клеток для другого прохождения через роллер, содержимое обрабатываемого мешка разбавляют промывочным буфером. После добавления промывочного буфера в обрабатываемый мешок, LOVO автоматически переходит на паузу и отображает экран Пауза для “перемешивания содержимого обрабатываемого мешка”. Без удаления мешка с чашки весов, продукт как следует перемешивают посредством осторожного выжимания мешка. Нажимают кнопку Возобновить.

8.13.45 Пауза для массажа углов обрабатываемого мешка. Когда обрабатываемый мешок пустеет, добавляют промывочный буфер в нижний узел обрабатываемого мешка для промывки мешка. После добавления промывочной текучей среды, LOVO автоматически переходит на паузу и отображает экран Пауза для “массажа углов IP мешка”. Когда отображается экран Пауза для “массажа углов IP мешка”, мешок не удаляют с чашки весов #2. Когда обрабатываемый мешок по-прежнему висит на чашке весов #2, массируют углы мешка для возвращения любых остаточных клеток в суспензию. Проверяют, чтобы мешок не качался на чашке весов и нажимают кнопку Возобновить.

8.13.46 Ожидание экрана Удаление продуктов. В конце процедуры LOVO, отображается экран Удаление продуктов. Когда появляется этот экран, можно манипулировать всеми мешками набора LOVO. Примечание: не касайтесь мешков до отображения экрана Удаление продуктов.

8.13.47 Удаление мешка с ретентатом. Помещают гемостат на трубе очень близко к узлу на мешке с ретентатом для удерживания суспензии клеток от оседания в трубке. Термически герметизируют трубку (согласно Примечанию к процессу 5ю12) ниже гемостата, убеждаясь в сохранении достаточной длины линии для сваривания на Стадии 8.13.48. Удаляют мешок с ретентатом.

8.13.48 Приготовление мешка с ретентатом для приготовления. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) принимающий конец соединения Луэр-лок 4-дюймового комплекта для переноса плазмы к мешку с ретентатом. Переносят мешок с ретентатом в BSC для использования на Стадии 8.14.11.

8.13.49 Удаление продуктов. Следуют инструкциям на экране Удаление продуктов. Закрывают все зажимы на наборе LOVO для предотвращения движения текучих сред.

8.13.50 Удаление продуктов. Нажимают на кнопку Далее. Все механические зажимы LOVO открываются и отображается экран Удаление набора.

8.13.51 Регистрация данных. Следуют инструкциям на экране Удаление набора. Нажимают кнопку “Далее”. Все механические зажимы LOVO закрываются и отображается экран Сводка результатов. Данные с экрана Сводка результатов регистрируют в Таблицу точно так как они отображаются. Закрывают все насосы и носитель фильтра. Удаляют набор, когда это нужно сделать согласно LOVO. *Примечание: все зарегистрированные значения времени регистрируются непосредственно с экрана Сводка результатов LOVO в формате час:мин:сек и в формате (час:мин:сек), когда это применимо.

8.13.52-8.13.54 Выбор протокола в ходе выключения LOVO. Следуют указаниям экрана LOVO.

8.13.55 Обзор Секции 8.13

8.14 Конечное приготовление и заполнение

8.14.1 Вычисление целевого объем/мешка. Из Таблицы, ниже, выбирают количество мешков CS750 для заполнения, целевой объем заполнения на один мешок, удаляемый объем для удерживания на один мешок и конечный целевой объем на один мешок, который соответствуют объему ретентата LOVO со Стадии 8.13.22.

Объем продукта LOVO	Объем CS10 для добавления к продукту	Конечный предсказываемый объем приготовленного продукта	Количество мешков для заполнения	Целевой объем для заполнения на один мешок	Удаляемый объем для удерживания на один мешок	Конечный целевой объем на один 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 Приготовление пустого CRF. Вычисление объема CS-10 и промывочного буфера LOVO для приготовления пустого мешка.

Конечный целевой объем на один мешок 8.14.1E A	Объем промывочного буфера LOVO для пустого мешка B = A / 2	Объем CS-10 для пустого мешка (мл) C = B
---	---	---

мл	мл	мл
----	----	----

8.14.3 Приготовление пустого CRF. Вне BSC, используя шприц с промывочным буфером LOVO, приготовленным на Стадии 8.11.29, добавляют объем, вычисленный на Стадии 8.14.2 В для опустошения мешка CS750 через Луер-лок. Примечание: приготовление пустого мешка CS750 не должно осуществляться асептически.

8.14.4 Приготовление пустого CRF. Используя шприц соответствующего размера, добавляют объем CS-10, вычисленный на Стадии 8.14.2, в такой же мешок CS750, приготовленный на Стадии 8.14.3. Помещают красный колпачок на мешок CS750.

8.14.5 Приготовление пустого CRF. Удаляют настолько много воздуха, насколько это возможно, из мешка CS-750. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) мешок CS750 настолько близко к мешку, насколько это возможно, удаляя трубки.

8.14.6 Приготовление пустого CRF. Маркируют мешок CS750 как “пустой CRF”, номером партии и временем начала/датой. Помещают пустой CRF на холодные пакеты до их размещения в CRF.

8.14.7 Вычисление необходимого объема IL-2. Вычисляют объем IL-2 для добавления к конечному продукту

Параметр	Формула	Результат
Конечный объем ретентата	Стадия 8.13.51	A. мл
Конечный приготовленный объем	$B = A \times 2$	B. мл
Конечная желаемая концентрация IL-2 (МЕ/мл)	300 МЕ/мл	C. 300 МЕ/мл
Необходимые МЕ IL-2	$D = B \times C$	D. МЕ
Рабочий исходный раствор IL-2 со Стадии 8.11.33	6×10^4 МЕ/мл	E. 6×10^4 МЕ/мл
Объем IL-2, добавляемый к конечному продукту	$F = D \div E$	F. мл

8.14.8 Сборка соединенного устройства. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) 4S-4M60 к комплекту Cell Connect CC2, заменяя один штырек в устройстве Cell Connect (B) 4-штырьковым концом 4S-4M60 коллектора на (G).

8.14.9 Сборка соединенного устройства. Стерильно приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) криомешки CS750 к связке, приготовленной на Стадии 8.14.8, заменяя один из четырех принимающих элементов Луэр-лока (E) в каждом мешке. Ссылаются на Стадию 8.14.1 для определения количества необходимых мешков.

8.14.10 Сборка соединенного устройства. Приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) мешки CS-10 к штырькам 4S-4M60. Выдерживают CS-10 холодными, размещая мешки между двумя холодными пакетами, кондиционированными при 2-8°C.

8.14.11 Перенос материалов в BSC.

Объект	№ Объекта или ссылка на Стадию	Количество
4-дюймовый комплект для переноса плазмы		1
аликвота IL-2 ($6,0 \times 10^4$)	8.11.33	1

Шприц соответствующего размера для добавления IL2	8.14.7F	1
Мешок LOVO с ретентатом	8.13.48	1
Красные колпачки		5

8.14.12 Приготовление TIL с IL-2. Используя шприц соответствующего размера, удаляют количество IL-2, определенное на Стадии 8.14.7, из аликвот “ 6×10^4 IL-2”.

8.14.13 Приготовление TIL с IL-2. Присоединяют шприц к мешку с ретентатом, приготовленному на Стадии 8.13.48, с помощью Луэр-лока и делают инъекцию IL-2.

8.14.14 Приготовление TIL с IL-2. Очищают линию посредством продувки воздуха из шприца через линию.

8.14.15 Маркировка мешка с приготовленными TIL. Закрывают зажим на комплекте для переноса и маркируют мешок как “Приготовленные TIL”, и удаляют мешок из BSC.

8.14.16 Если это применимо: отбор образцов согласно плану работы с образцами. Если имеется остаточная аликвота “ 6×10^4 IL-2”, приготовленная на Стадии 8.11.33, удаляют ~5 мл сохранившегося образца согласно плану работы с образцами, используя шприц соответствующего размера, и распределяют в 50-мл коническую пробирку.

8.14.17 Если это применимо: отбор образцов согласно плану работы с образцами. Маркируют маркировкой согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят при 2-8°C до подачи на Вход для исследования согласно плану работы с образцами.

8.14.18 Если это применимо: отбор образцов согласно плану работы с образцами. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS заполнен для удаления образца.

8.14.19 Добавление мешка с приготовленными TIL в устройство. После добавления IL-2, приваривают (согласно Примечанию к процессу 5.11) мешок “Приготовленных TIL” к оставшемуся штырьку (A) на устройстве, приготовленном на Стадии 8.14.10.

8.14.20 Добавление CS10. Переносят собранное устройство с присоединенными мешками CS-750 и CS-10 с приготовленными TIL в BSC. Примечание: мешок CS-10 и все мешки CS-750 размещают между двумя холодными пакетами, предварительно кондиционированными при 2-8°C. Не помещают мешка с Приготовленными TIL на холодных пакетах.

8.14.21 Добавление CS10. Убеждаются, что закрыты все зажимы на устройстве. Поворачивают запорный кран, так что шприц закрывается.

8.14.22 Переключение шприцов. Отбирают ~10 мл воздуха в 100-мл шприц и заменяют 60-мл шприц на устройстве.

8.14.23 Добавление CS10. Поворачивают запорный кран так, что линия к мешкам CS750 закрывается. Открывают зажимы к мешкам CS-10 и набирают в шприц объем, вычисленный на Стадии 8.14.1B. Примечание: будет использоваться множество шприцов для добавления соответствующего объема CS-10. Примечание: регистрируют объем из каждого шприца на Стадии 8.14.26

8.14.24 Добавление CS10. Закрывают зажимы к CS-10 и открывают зажимы к мешку с приготовленными ТП, и добавляют CS-10. Примечание: сначала добавляют 10,0 мл CS10 приблизительно при 10,0 мл/минута. Добавляют оставшийся CS-10 при примерной скорости 1,0 мл/сек. Примечание: используют множество шприцов для добавления соответствующего объема CS-10. Шприц не используют повторно после использования его для распределения.

8.14.25 Добавление CS10. Регистрируют время. Примечание: целевое время от первого добавления CS-10 до начала замораживания составляет 30 минут.

8.14.26 Добавление CS10. Регистрируют объем каждого добавления CS10 и общий добавленный объем. Общий объем совпадает с вычисленным объемом со Стадии 8.14.1B

8.14.27 Добавление CS10. Закрывают все зажимы к мешкам CS10.

8.14.28 Приготовление мешков CS-750. Поворачивают запорный кран так, что шприц открывается. Открывают зажимы к мешку с приготовленными ТП и отбирают суспензию, останавливаясь как раз перед тем, как суспензия достигнет запорного крана.

8.14.29 Приготовление мешки CS-750. Закрывают зажимы к мешку с приготовленными ТП. Поворачивают запорный кран так, что он открывается в пустые мешки CS750 для конечного продукта.

8.14.30 Приготовление мешки CS-750. Используя новый шприц, удаляют настолько много воздуха насколько это возможно из мешков CS750 с конечным продуктом, отбирая воздух. Поддерживая давление на плунжере шприца, перекрывают зажимами горлышко мешка.

8.14.31 Приготовление мешки CS-750. Отбирают ~20 мл воздух в новый 100-мл шприц и присоединяют его к устройству. Примечание: каждый мешок CS-750 с конечным продуктом должен находиться между двумя холодными пакетами для поддержания суспензии приготовленных ТП холодной.

8.14.32 Распределение клеток. Поворачивают запорный кран так, что линия к мешкам с конечным продуктом, закрывается. Набирают объем, вычисленный на Стадии 8.14.1, из мешка с приготовленными ТП в шприц. Примечание: для получения правильного объема можно использовать множество шприцов.

8.14.33 Распределение клеток. Поворачивают запорный кран так, что линия к мешку с приготовленными ТП закрывается. Работая с одним мешком с конечным продуктом за раз, распределяют клетки в мешок с конечным продуктом. Регистрируют объем клеток, добавляемых в каждый мешок CS750 на Стадии 8.14.35

8.14.34 Распределение клеток. Очищают линию с помощью воздуха из шприца, так что клетки находятся вровень с верхом штырькового узла. Закрывают зажим на заполненном мешке. Повторяют Стадию 8.14.29 - Стадию 8.14.34 для каждого мешка с конечным продуктом, осторожно перемешивают содержимое мешка с приготовленными ТП между закрыванием каждого мешка.

8.14.35 Распределение клеток. Регистрируют объем ТП, размещенных в каждом мешке с конечным продуктом, ниже.

8.14.36 Удаление воздуха из мешков с конечным продуктом и их хранение. После заполнения последнего мешка с конечным продуктом, закрывают все зажимы.

8.14.37 Удаление воздуха из мешков с конечным продуктом и их хранение. Набирают 10 мл воздуха в новый 100-мл шприц и заменяют шприц на устройстве.

8.14.38 Удаление воздуха из мешков с конечным продуктом и их хранение. Манипулируя одним мешком за раз, отбирают весь воздух из каждого мешка с продуктом плюс объем продукта для хранения, определенный на Стадии 8.14.1D. Примечание: при удалении объема образца инвертируют шприц и используют воздух для очистки линии до верхнего узла мешка с продуктом. Перекрывают зажимами линию к мешку после удаления объема для хранения и воздуха.

8.14.39 Регистрация удаленного объема. Регистрируют объем для хранения, удаленный из каждого мешка.

8.14.40 Распределение объема для хранения. Распределяют объем для хранения в 50-мл коническую пробирку и маркируют пробирку как “Объем для хранения” и номером партии. Повторяют Стадию 8.14.37-Стадию 8.14.39 для каждого мешка.

8.14.41 Приготовление конечного продукта для криоконсервирования. С помощью гемостата, перекрывают зажимами линии вблизи мешков. Удаляют шприц и закрывают красным колпачком Луер-лок на устройстве, на котором был шприц. Переносят устройство из BSC.

8.14.42 Приготовление конечного продукта для криоконсервирования. Термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) при F, удаляя пустой мешок с ретентатом и мешки CS-10. Примечание: сохраняют Луер-лок для шприца на устройстве. Утилизируют пустые мешки для ретентата и CS-10.

8.14.43 Осуществление визуального осмотра. Примечание: Стадию 8.14.43 - Стадию 8.14.46 можно осуществлять одновременно с Стадией 8.14.47- Стадией 8.14.68.

8.14.44 Образец маркировки конечного продукта. Маркируют мешки с конечным продуктом. Присоединяют этикетку образца конечного продукта ниже.

8.14.45 Приготовление конечного продукта для криоконсервирования. Удерживают криомешки на холодном пакете или при 2-8°C до криоконсервирования.

8.14.46 Прикрепление наружных этикеток. Убеждаются, что выпущенные QA наружные этикетки, которые будут прикрепляться к маркировкам кассет, соответствуют маркировке конечного продукта. Прикрепляют выпущенные QA наружные этикетки к кассетам. Прикрепляют образец наружной этикетки ниже:

8.14.47 Удаление образца для счета клеток. Используя пипетку соответствующего размера, удаляют 2,0 мл образца для хранения, удаленного на Стадии 8.14.38, и помещают в 15-мл коническую пробирку для использования с целью счета клеток.

8.14.48 Осуществление счета клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 согласно SOP-00314 и Примечанию к процессу 5.14. Примечание: разбавляют только один образец до соответствующего разбавления, чтобы проверить,

является ли разбавление достаточным. Разбавляют дополнительные образцы до соответствующего коэффициента разбавления и переходят к счету.

8.14.49 Регистрация объемов образцов для счета клеток. Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.14.50 Определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для отсчета клеток	8.14.49A + 8.14.49B	C. мкл
Коэффициент умножения	$C \div 8.14.49A$	D.

8.14.51 Выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей согласно SOP – 00314. Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.14.52 Регистрация имени файла, жизнеспособности и отсчетов клеток согласно Nucleoview.

8.14.53 Определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.14.52A + 8.14.52B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.14.52C + 8.14.52D) \div 2$	F. клеток/мл

8.14.54 Определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.14.53F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.14.53F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.14.55 Определение того, находятся ли оба отсчета в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.14.52 \text{ C и D} \geq 8.14.54G$	
Верхний предел	$8.14.52 \text{ C и D} \leq 8.14.54H$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой “Нет” осуществляют второй набор отсчетов на Стадиях 8.14.56-8.14.63

8.14.56 Если это применимо: получение отсчетов клеток. Осуществляют счет клеток и вычисления с использованием NC-200 согласно SOP-00314 и Примечания к процессу 5.14. Примечание: разбавление может регулироваться на основе ожидаемой концентрации клеток.

8.14.57 Если это применимо: Регистрация объема образцов для счета клеток.

8.14.58 Если это применимо: определение коэффициента умножения

Параметр	Формула	Результат
Общий объем образцов для счета клеток	8.14.57A + 8.14.57B	C. мл
Коэффициент умножения	$C \div 8.14.57A$	D.

8.14.59 Если это применимо: выбор протоколов и введение коэффициентов умножения. Убеждаются, что выбран протокол “анализ счета жизнеспособных клеток”, вводят все коэффициенты умножения и объемы образцов и разбавителей. Примечание: если не требуется разбавления, вводят “образец [мкл]” = 200, “разбавление [мкл]” = 0

8.14.60 Если это применимо: Регистрация отсчетов клеток согласно Nucleoview

8.14.61 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток и жизнеспособности в полученных отсчетах клеток.

Параметр	Формула	Результат
Жизнеспособность	$(8.14.60A + 8.14.60B) \div 2$	E. %
Концентрация жизнеспособных клеток	$(8.14.60C + 8.14.60D) \div 2$	F. клеток/мл

8.14.62 Если это применимо: определение верхнего и нижнего пределов для отсчетов.

Параметр	Формула	Результат
Нижний предел	$8.14.61F \times 0,9$	G. клеток/мл
Верхний предел	$8.14.61F \times 1,1$	H. клеток/мл

8.14.63 Если это применимо: определение того, находятся ли отсчеты в приемлемых пределах

Параметр	Формула	Результат (Да/Нет)
Нижний предел	$8.14.60 \text{ C и D} \geq 8.14.62G$	
Верхний предел	$8.14.60 \text{ C и D} \leq 8.14.62H$	

Примечание: если любой из результатов представляет собой «Нет», переходят на Стадию 8.14.64 для определения среднего значения

8.14.64 Если это применимо: определение среднего значения концентрации жизнеспособных клеток от всех четырех получаемых отсчетов.

8.14.65 Вычисление потока. Образец для цитометрии. Осуществляют вычисление, чтобы убедиться, что концентрация клеток является достаточной для отбора образцов для проточной цитометрии.

Концентрация жизнеспособных клеток со Стадии 8.14.53 F* или Стадии 8.14.61 F* или Стадии 8.14.64 E* A	Необходимый целевой объем для $6 \times 10^7 \text{ TVC}$ $B = 6 \times 10^7 \text{ клеток/ A}$	Выполняется ли условие $B \leq 1,0$ мл? (Да/Нет**)
клеток/мл	мл	

*Отмеченная ссылка на стадию используется для определения концентрации жизнеспособных клеток **Примечание: если ответ “Нет”, обращаются к локальному управлению.

8.14.66 Вычисление количества IFN-γ. Осуществляют вычисление образца для того, чтобы убедиться, что концентрация клеток для отбора образцов IFN-γ является достаточной.

Концентрация жизнеспособных клеток со Стадии 8.14.53 F* или	Объем необходимый для получения минимума	Выполняется ли условие $B \leq 1,0$ мл? (Да/Нет**)
---	--	--

Стадии 8.14.61 F* или Стадии 8.14.64 Е* А	$1,5 \times 10^7$ TVC В = $1,5 \times 10^7$ клеток/А	
клеток/мл	мл	

*Отмеченная ссылка используется для определения концентрации жизнеспособных клеток **Примечание: если ответ “Нет”, обращаются к локальному управлению.

8.14.67 Регистрация результатов. Заполнение форм для подачи образцов.

8.14.68 Термическая герметизация. После определения объемов образцов, термически герметизируют (согласно Примечанию к процессу 5.12) мешки с конечным продуктом настолько близко к мешкам, насколько это возможно, для удаления из устройства.

8.14.69 Маркировка и сбор образцов согласно плану работы с образцами.

Образец	Количество контейнеров	Объем образца добавления, каждый	Тип контейнера	Назначение
*Микоплазма	1	1,0 мл	15-мл коническая пробирка	Вход
Эндотоксин	2	1,0 мл	2-мл криофлакон	Вход
Грамм-окрашивание	1	1,0 мл	2-мл криофлакон	Вход
IFN-g	1	1,0 мл	2-мл криофлакон	Вход
Проточная цитометрия	1	1,0 мл	2-мл криофлакон	Вход
**Стерильность ВаСТ	2	1,0 мл	бутылка ВаСТ	Вход
Сохраняемые QC	4	1,0 мл	2-мл криофлакон	CRF
Сопутствующие флаконы	10	0,5 мл	2-мл криофлакон	CRF

*Примечание: для образца микоплазмы, добавляют объем суспензии приготовленных клеток в 15-мл коническую пробирку, маркированную “Разбавитель для микоплазмы”, со стадии 8.12.55.

**Примечание: переходят на Стадию 8.14.70 для инокуляции ВаСТ.

8.14.70 Стерильность и ВаСТ. Исследуют отбор образцов. В BSC, удаляют 1,0-мл образец из суспензии сохраняемых клеток, собранной на Стадии 8.14.38, используя шприц соответствующего размера, и инокулируют анаэробную бутылку. Повторяют то же самое для аэробной бутылки. Примечание: бутылки для хранения ВаСТ находятся при комнатной температуре и защищены от света.

8.14.71 Маркировка и хранение образцов. Маркируют все образцы маркировками согласно плану работы с образцами по настоящему изобретению и хранят соответствующим образом до переноса на Вход. Примечание: переходят к секции 8.15 для криоконсервирования конечного продукта и образцов.

8.14.72 Направление на отбор образцов. Убеждаются, что список операций плана по работе с образцами LIMS выполнен, для удаления образцов.

8.14.73 Направление образцов. Подают на Вход все исследуемые образцы, День 22.

8.14.74 Мониторинг окружающей среды. После процессирования, проверяют BSC и осуществляют мониторинг персонала.

8.14.75 Обзор Секции 8.14

8.15 Кριοконсервирование конечного продукта

8.15.1 Приготовление морозилки с контролируемой скоростью изменения температуры. Проверяют, настроены ли CRF перед замораживанием. Регистрируют оборудование CRF. Осуществляют кριοконсервирование.

8.15.2 Установка зондов CRF. Прокалывают мембрану на пустом мешке CRF. Вставляют датчик температуры в 6-мл флакон.

8.15.3 Помещение конечного продукта и образцов в CRF. Помещают пустой мешок в предварительно кондиционированную кассету и переносят примерно в середину стеллажа CRF. Переносят кассеты с конечным продуктом в стеллаж CRF, а флаконы в стеллаж для флаконов CRF.

8.15.4 Размещение конечных продуктов и образцов в CRF. Переносят стеллажи с продуктом и стеллажи с флаконами в CRF. Регистрируют время, когда продукт переносится в CRF, и температуру камеры на Стадии 8.15.5. Примечание: равномерно распределяют стеллажи для кассет и флаконов в CRF, оставляя как можно больше пространства между полками.

8.15.5 Определение времени, необходимого для достижения $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, и переход к осуществлению CRF. После того, как температура в камере достигает $4^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$, начинают процесс. Регистрируют время.

Параметр	Формула	Значение
Время, когда конечный продукт переносят в CRF	(час: мин)	
Температура, при которой конечный продукт переносят в CRF	C монитора	$^{\circ}\text{C}$
B. Время начала CRF	(час:мин)	
Время, прошедшее от приготовления до начала CRF	$C = B - \text{Стадия 8.14.25A}$	мин

8.15.6 Завершение CRF и хранение. Останавливают CRF после завершения процесса. Удаляют кассеты и флаконы из CRF. Переносят кассеты и флаконы в паровую фазу LN2 для хранения. Регистрируют положение хранения.

Сводка дополнительного процессирования

Дополнительное процессирование: конечный лекарственный продукт

(День 22) Определение клеток CD3+ в День 22 REP с помощью проточной цитометрии

(День 22) Метод окрашивания по Граму (GMP)

(День 22) Исследование на бактериальные эндотоксины посредством анализа Gel Clot LAL (GMP)

(День 16) Анализ стерильности BacT (GMP)

(День 16) Детектирование ДНК микоплазмы с помощью TD-PCR (GMP)

Атрибуты приемлемого внешнего вида (Стадия 8.14.43)

(День 22) Анализ стерильности ВaсТ (GMP)

(День 22) Анализ IFN-гамма

ПРИМЕР 2. РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ TIL С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НУКЛЕАЗЫ TALE

[0601] Этот пример описывает использование стадии редактирования генома в сочетании со способом получения TIL, такого как способ, показанный на Фигуре 20.

[0602] Оптимизация электропорообразования TIL человека осуществляется следующим образом. Будут идентифицированы четыре-6 линий TIL пред-REP, полученных из меланомы, которые экспрессируют >25% PD1. Выбранные линии TIL будут отстаиваться, отстаиваться и активироваться, работая с 1 линией за раз. Пять миллионов активированных TIL будут подвергаться воздействию электропорообразования с каждой из следующих контрольных или исследуемых РНК: без контроля электропорообразования (NE); без контроля РНК; контроль с трансфицированием mRNA зеленого флуоресцентного белка (GFP), контроль CD52 TALEN KO, PD1 TALEN, LAG-3 TALEN и TIM-3 TALEN. Жизнеспособные клетки будут считаться и аликвота будет устанавливаться помимо измерений эффективности трансфицирования (экспрессирования GFP). Клетки после электропорообразования будут размножаться посредством REP. Пост-REP TIL будут оцениваться на жизнеспособность клеток и кратность размножения (прибор для счета клеток) и на нокдаун целевых генов (проточная цитометрия и qPCR). Целевые результаты представляют собой жизнеспособность >80% или в пределах 10% от NE; трансфицирование >70%; кратность размножения TIL в пределах от 30% NE; и нокаут >50%.

[0603] Осуществление медируемого TALEN нокаута PD-1 для способа получения TIL происходит следующим образом. Будут использовать до 6 свежих опухолей от нескольких гистологических образцов, которые могут включать меланому, саркому и рак молочной железы и легких. Приготовления в лабораторном масштабе будут осуществляться согласно способам, показанным на Фигурах 20 и 21. Условия электропорообразования из предыдущих экспериментов будут применяться в заранее определенных временных точках каждого из процессов. Пост-REP TIL будут оцениваться на: жизнеспособность клеток и кратность размножения (прибор для счета клеток); фенотипы клеток (проточная цитометрия); репертуар TCR V β (проточная цитометрия); эффекторные функции Т-клеток (продуцирование IFN- γ при повторном стимулировании); и нокдаун целевых генов (проточная цитометрия и qPCR). Целевые результаты представляют собой: жизнеспособность >80% или в пределах 10% от NE; трансфицирование >70%; кратность размножения в пределах 30% от NE; сохранение линий/подмножеств Т-клеток по сравнению с TIL, полученными с помощью процесса 2А; адекватное сильнодействие TIL и нокаут PD-1 >50%. После этой работы, будет осуществляться и полностью характеризоваться полномасштабное приготовление TIL с нокдауном PD-1.

[0604] Проверка сайленсирования двух дополнительных целевых генов в дополнение к PD-1 также будет осуществляться.

ПРИМЕР 3. Медируемая TALEN дезактивация PD-1 в TIL

[0605] Этот пример описывает медируемую TALEN дезактивацию PD-1 в сочетании со способом получения TIL, описанным в настоящем документе, таким как способ, показанный на Фигуре 20 или на Фигуре 21. Способ получения TIL может включать раннее добавление ОКТ-3 и/или агониста 4-1BB в среду для культивирования клеток, *например*, как иллюстрируется в варианте осуществления 2 Фигуры 21. ОКТ-3 и/или агонист 4-1BB могут необязательно добавляться, начиная с Дня 0 или Дня 1 первого размножения или второго размножения.

[0606] Конструирование TALEN и электропорообразование может осуществляться согласно способам, описанным Menger, et al., *Cancer Res.*, 2016 Apr 15; 76(8):2087-93, Gautron, et al., *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9:312-321, или в патенте США № 9458439, описания каждого из которых включается в настоящий документ в качестве ссылки. TALEN, нацеленные на ген PD-1, будут продуцироваться, *например*, используя метод сборки в твердой фазе, описанный Daboussi et al., *Nat Commun* 2014; 5:3831, которая включается в настоящий документ в качестве ссылки, или могут быть получены коммерчески от Trilink Biotechnologies или других поставщиков, как описано в Gautron, et al., *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9:312-321. Можно использовать процедуру, описанную в Gautron, et al., *et al.*, *Molecular Therapy: Nucleic Acids* 2017, 9:312-321, и описанную в настоящем документе в другом месте для активирования TIL, где TIL активируются с использованием шариков с активатором Т-клеток CD3/CD28 человека Dynabeads (доступных коммерчески от Invitrogen) при отношении шариков к CD3⁺ клеткам 1:1 или комплексов активатора Т-клеток человека и антитела CD3/CD28, таких как активатор CD3/CD28 Immunocult (доступный коммерчески от StemCell Technologies). В целом 5×10^6 TIL/180 мкл среды для цитопорообразования BTX Т можно смешивать примерно с 10-20 мкг транскрибированной *in vitro* mRNA TALEN (набор mMACHINE T7; Ambion), перед электропорообразованием с использованием системы BTX Agile Pulse (Harvard Apparatus). Клетки после электропорообразования могут размножаться с помощью методов пред-REP и REP, описанных в настоящем документе в другом месте. Пост-REP TIL будет оцениваться на жизнеспособность и кратность размножения клеток (прибор для счета клеток), и на нокдаун PD-1 (проточная цитометрия и qPCR). Целевые результаты представляют собой жизнеспособность >80% или в пределах 10% от контроля “без электропорообразования” (NE); трансфицирование >70%; кратность размножения TIL в пределах 30% от NE и нокаут PD-1 >50%. Можно использовать способы электропорообразования известные в данной области, такие как описаны в патентах США №№ 6010613 и 6078490, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок.

[0607] Оптимизация импульсного электропорообразования может осуществляться с использованием способов, описанных в настоящем документе, или следующим образом. Первый набор экспериментов осуществляется на TIL для определения диапазона напряжений, при которых клетки трансфицировались бы. Исследуют пять различных

программ:

Программа	Группа 1				Группа 2				Группа 3			
	Импульсы	В	Продолжительность (мсек)	Интервал (мсек)	Импульсы	В	Продолжительность (мсек)	Интервал (мсек)	Импульсы	В	Продолжительность (мсек)	Интервал (мсек)
1	1	600	0,1	0,2	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2
2	1	900	0,1	0,2	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
3	1	1200	0,1	0,2	1	1200	0,1	100	4	130	0,2	2
4	1	1200	0,1	10	1	900	0,1	100	4	130	0,2	2
5	1	900	0,1	20	1	600	0,1	100	4	130	0,2	2

[0608] Электропорообразование TIL может осуществляться в кювете с зазором 0,4 см (порядок примерно 10^6 клеток/мл) примерно с 20 мкг плазмид, кодирующих GFP и контрольных плазмид pUC, используя различные программы электропорообразования. Примерно через 24 часа после электропорообразования, экспрессирование GFP в клетках после электропорообразования анализируют с помощью проточной цитометрии для определения эффективности трансфицирования. Минимальное напряжение необходимое для электропорообразования плазмид в TIL ранее описано в Публикации заявки на Международный патент № WO 2014/184744 и в публикации заявки на патент США № US 2013/0315884 A1, описания которых включаются в настоящий документ в качестве ссылок, и программа 3 и 4, каждая, делают возможным эффективный процесс сайленсирования TALEN для TIL.

[0609] Конструкт TALEN показанный на Фигуре 23 нацелен на экзон 2 гена Pdcd1, как показано, и может использоваться для дезактивации PD1.

[0610] Примеры, приведенные выше предложены, чтобы дать специалистам в данной области полное описание и картину того, как осуществлять и использовать варианты осуществления композиций, систем и способов по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения духа того, что авторы считают своим изобретением. Модификации, описанных выше режимов осуществления изобретения очевидные для специалистов в данной области, как предполагается, находятся в рамках следующей далее формулы изобретения. Все патенты и публикации, рассмотренные в описании, являются показателями уровней компетентности специалистов в области, к которой относится изобретение.

[0611] Все заголовки и обозначения секций используются только целей ясности и ссылок и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом. Например, специалист в данной области увидит полезность объединения различных аспектов под различными заголовками и в различных секциях как соответствующую духу и рамкам изобретения, описанного в настоящем документе.

[0612] Все ссылки, цитируемые в настоящем документе, тем самым включаются в качестве ссылок в настоящий документ во всей своей полноте и для всех целей до такой же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация или патент, или заявка на патент конкретно и индивидуально указывалась бы как включенная в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[0613] Множество модификаций и вариантов настоящей заявки можно осуществить без отклонения от ее духа и рамок, как будет очевидно специалистам в данной области. Конкретные варианты осуществления и примеры, описанные в настоящем документе, предлагаются только в качестве примеров, и заявка должна ограничиваться только терминами прилагаемой формулы изобретения, вместе с полными рамками эквивалентов, к которым эти пункты формулы изобретения относятся.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТЛ) в терапевтическую популяцию ТЛ, включающий:

(а) получение первой популяции ТЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему, где фрагменты опухоли получены из опухоли, резецированной у пациента;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, и, необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции ТЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТЛ, где вторая популяция ТЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТЛ, и где переход от стадии (b) до стадии (с) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТЛ дополнительным ИЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТЛ, где третья популяция ТЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) сбор терапевтической популяции ТЛ, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (е) осуществляется без открывания системы;

(f) перенос собранной популяции ТЛ на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы; и

(g) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТЛ.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТЛ, на Стадии (f), используя способ криоконсервирования.

3. Способ по п.1, где способ криоконсервирования осуществляется, используя отношения 1:1 собранной популяции ТЛ к среде криоконсервирования.

4. Способ по п.1, где антиген-презентирующие клетки представляют собой моноклеары периферической крови (РВМС).

5. Способ по п.4, где РВМС являются облученными и аллогенными.

6. Способ по п.4, где РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9-14 на Стадии (d).

7. Способ по п.1, где антиген-презентирующие клетки представляют собой искусственные антиген-презентирующие клетки.

8. Способ по п.1, где сбор на Стадии (е) осуществляется с использованием мембранной системы процессирования клеток.

9. Способ по п.1, где сбор на Стадии (е) осуществляется с использованием системы процессирования клеток LOVO.

10. Способ по п.1, где множество фрагментов содержит примерно 4 - примерно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

11. Способ по п.1, где множество фрагментов содержит примерно от 30 примерно до 60 фрагментов с общим объемом примерно от 1300 мм^3 примерно до 1500 мм^3 .

12. Способ по п.9, где множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм^3 .

13. Способ по п.1, где множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общей массой примерно от 1 грамма примерно до 1,5 грамма.

14. Способ по п.1, где среда для культивирования клеток предусматривается в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для клеток Xuri.

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

16. Способ по любому из предыдущих пунктов, где концентрация IL-2 составляет примерно 10000 МЕ/мл - примерно 5000 МЕ/мл.

17. Способ по п.15, где IL-15 концентрация составляет примерно 500 МЕ/мл - примерно 100 МЕ/мл.

18. Способ по п.1, где IL-21 концентрация составляет примерно 20 МЕ/мл - примерно 0,5 МЕ/мл.

19. Способ по п.1, где инфузионный мешок на Стадии (f) представляет собой инфузионный мешок, содержащий Hypothermosol.

20. Способ по п.3, где среда для криоконсервирования содержит диметилсульфоксид (DMSO).

21. Способ по п.17, где среда для криоконсервирования содержит 7% - 10% DMSO.

22. Способ по п.1, где первый период на Стадии (с) и второй период на Стадии (е), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 10 дней, 11 дней или 12 дней.

23. Способ по п.1, где первый период на Стадии (с) и второй период на Стадии (е), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 11 дней.

24. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 22 дня.

25. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 20 дней примерно до 22 дня.

26. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 15 дней примерно до 20 дней.

27. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно

от 10 дней примерно до 20 дней.

28. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 15 дней.

29. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются за 22 дня или меньше.

30. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются за 20 дней или меньше.

31. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются за 15 дней или меньше.

32. Способ по п.1, где стадии (а) - (f) осуществляются за 10 дней или меньше.

33. Способ по п.2, где стадии (а) - (f) и криоконсервирование осуществляются за 22 дня или меньше.

34. Способ по любому из пп.1-33, где терапевтическая популяция ТП, собранная на Стадии (е), содержит достаточно ТП для терапевтически эффективного дозирования ТП.

35. Способ по п.34, где количество ТП достаточное для терапевтически эффективного дозирования составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

36. Способ по любому из пп.1-35, где стадии (b) - (е) осуществляются в одном контейнере, где осуществление стадий (b) - (е) в одном контейнере дает в результате увеличение выхода ТП на одну резецированную опухоль по сравнению с осуществлением стадий (b) - (е) в нескольких контейнерах.

37. Способ по любому из пп.1-36, где антиген-презентирующие клетки добавляют в ТП в ходе второго периода на Стадии (d) без открывания системы.

38. Способ по любому из пп.1-37, где третья популяция ТП на Стадии (d) обеспечивает увеличение эффективности, увеличение продуцирования интерферона-гамма, увеличение поликлональности, повышение среднего уровня IP-10 и/или повышение среднего уровня MCP-1 при введении субъекту.

39. Способ по любому из пп.1-38, где третья популяция ТП на Стадии (d) обеспечивает, по меньшей мере, пятикратное или более продуцирование интерферона-гамма, при введении субъекту.

40. Способ по любому из пп.1-39, где третья популяция ТП на Стадии (d) представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит увеличенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции ТП, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

41. Способ по любому из пп.1-40, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные из третьей популяции ТП, демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

42. Способ по любому из пп. 1-41, где риск микробного загрязнения уменьшается по сравнению с открытой системой.

43. Способ по любому из пп. 1-42, где ТП со стадии (g) вводят пациенту посредством инфузии.

44. Способ по любому из пп. 1-43, где множество фрагментов содержит примерно 4 фрагмента.

45. Способ по любому из пп. 1-44, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист ОХ40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого

46. Способ по п. 45, где редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист ОХ40 вводится в среду для культивирования клеток.

47. Способ по п. 45, где редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1BB и/или агонист ОХ40 вводится в среду для культивирования клеток.

48. Способ по любому из пп. 1-47, где редактирование генома осуществляется на ТП из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

49. Способ по любому из пп. 1-47, где редактирование генома осуществляется на ТП от первого размножения, или ТП от второго размножения или как от того, так и от другого

50. Способ по любому из пп. 1-47, где редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

51. Способ по любому из пп. 1-47, где редактирование генома осуществляется до стадии (c), до стадии (d) или до стадии (e).

52. Способ по любому из пп. 1-47, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

53. Способ по любому из пп. 1-47, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

54. Способ по любому из пп. 1-47, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования ТП для ОКТ-3.

55. Способ по любому из пп. 1-54, где редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТП.

56. Способ по п. 55, где указанный один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8,

CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

57. Способ по п.55, где указанный один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

58. Способ по любому из пп.1-54, где редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

59. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

60. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

61. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает способ CRISPR.

62. Способ по п.61, где способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

63. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает способ TALE.

64. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает цинк-пальцевой способ.

65. Способ лечения субъекта с раковым заболеванием, способ включает введение размноженных инфультирующих опухоль лимфоцитов (TIL) включает:

(a) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции TIL в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции TIL, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции TIL, где вторая популяция TIL, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция TIL, и где переход от стадии (b) до стадии (c) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТПЛ дополнительным ИЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТПЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТПЛ, где третья популяция ТПЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТПЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) сбор терапевтической популяции ТПЛ, полученной на Стадии (d), где переход от стадии (d) до стадии (е) осуществляется без открывания системы; и

(f) перенос собранной популяции ТПЛ на Стадии (е) в инфузионный мешок, где переход от стадии (е) до (f) осуществляется без открывания системы;

(g) необязательное криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТПЛ со стадии (f), используя способ криоконсервирования;

(h) введение терапевтически эффективной дозировки третьей популяции ТПЛ из инфузионного мешка со стадии (g) пациенту; и

(i) в любой момент времени в ходе способа стадий (a)-(f), редактирование генома, по меньшей мере, части ТПЛ.

66. Способ по п.65, где терапевтическая популяция ТПЛ, собранная на Стадии (е), содержит достаточно ТПЛ для введения терапевтически эффективной дозы ТПЛ на Стадии (h).

67. Способ по п.66, где количество ТПЛ достаточное для введения терапевтически эффективной дозы на Стадии (h) составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

68. Способ по п.67, где антиген-презентирующие клетки (АРС) представляют собой РВМС.

69. Способ по п.68, где РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9-14 на Стадии (d).

70. Способ по любому из пп.65-69, где до введения терапевтически эффективной дозировки клеток ТПЛ на Стадии (h), пациенту вводится режим немиелоаблативной лимфодеплеции.

71. Способ по п.70, где режим немиелоаблативной лимфодеплеции включает стадии введения циклофосфида при дозе $60 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ в течение двух дней с последующим введением флударабина при дозе $25 \text{ мг/м}^2/\text{день}$ в течение пяти дней

72. Способ по любому из пп.65-71, дополнительно включающий стадию лечения пациента с помощью режима с высокими дозами ИЛ-2, начиная со дня после введения клеток ТПЛ пациенту на Стадии (h).

73. Способ по п.72, где режим с высокими дозами ИЛ-2 включает 600000 или 720000 МЕ/кг, которые вводятся как 15-минутная внутривенная инфузия болюса каждые восемь часов, пока не возникнет толерантность.

74. Способ по любому из пп.65-73, где третья популяция ТПЛ на Стадии (d)

представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит повышенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции ТП, где эффекторные Т-клетки и/или центральные клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

75. Способ по любому из пп.65-74, где эффекторные Т-клетки и/или центральные клетки памяти в терапевтической популяции ТП демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

76. Способ по любому из пп.65-75, где рак выбирается из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака легких, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызываемого вирусом папилломы человека, рака головы и шеи (включая карциному сквамозных клеток головы и шеи (HNSCC)), рака почек и почечноклеточного рака.

77. Способ по любому из пп.65-76, где рак выбирается из группы, состоящей из меланомы, HNSCC, рака шейки матки и NSCLC.

78. Способ по любому из пп.65-77, где рак представляет собой меланому.

79. Способ по любому из пп.65-78, рак представляет собой HNSCC.

80. Способ по любому из пп.65-79, рак представляет собой рак шейки матки.

81. Способ по любому из пп.65-80, рак представляет собой NSCLC.

82. Способ по любому из пп.65-81, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

83. Способ по п.82, где редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

84. Способ по п.82, где редактирование генома осуществляется до того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

85. Способ по любому из пп.65-84, где редактирование генома осуществляется на ТП из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

86. Способ по любому из пп.65-84, где редактирование генома осуществляется на ТП от первого размножения или на ТП от второго размножения, или как от того, так и от другого.

87. Способ по любому из пп.65-84, где редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

88. Способ по любому из пп.65-84, где редактирование генома осуществляется до

стадии (с), до стадии (d) или до стадии (е).

89. Способ по любому из пп.65-88, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

90. Способ по любому из пп.65-88, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения, и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

91. Способ по любому из пп.65-88, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования TIL для ОКТ-3.

92. Способ по любому из пп.65-91, где редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL.

93. Способ по п.92, где указанный один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATE, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

94. Способ по п.92, где указанный один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

95. Способ по любому из пп.65-91, где редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции TIL, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

96. Способ по любому из пп.65-95, где редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

97. Способ по любому из пп.65-95, где редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

98. Способ по любому из пп.65-95, где редактирование генома включает способ CRISPR.

99. Способ по п.98, где способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

100. Способ по любому из пп.65-95, где редактирование генома включает способ TALE.

101. Способ по любому из пп.65-95, где редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

102. Способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ, включающий:

(а) добавление переработанных фрагментов опухоли из опухоли, резецированной у пациента, в замкнутой системе для получения первой популяции ТИЛ;

(б) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТИЛ в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции ТИЛ, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТИЛ, где вторая популяция ТИЛ, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТИЛ, и где переход от стадии (а) до стадии (б) осуществляется без открывания системы;

(с) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТИЛ дополнительным ИЛ-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АПС), для получения третьей популяции ТИЛ, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТИЛ, где третья популяция ТИЛ представляет собой терапевтическую популяцию ТИЛ, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (б) до стадии (с) осуществляется без открывания системы;

(д) сбор терапевтической популяции ТИЛ, полученной на Стадии (с), где переход от стадии (с) до стадии (д) осуществляется без открывания системы;

(е) перенос собранной популяции ТИЛ со стадии (д) в инфузионный мешок, где переход от стадии (д) до (е) осуществляется без открывания системы; и

(ф) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части ТИЛ.

103. Способ по п.102, где терапевтическая популяция ТИЛ, собранная на Стадии (д), содержит достаточно ТИЛ для терапевтически эффективного дозирования ТИЛ.

104. Способ по п.103, где количество ТИЛ достаточное для терапевтически эффективного дозирования составляет примерно от $2,3 \times 10^{10}$ примерно до $13,7 \times 10^{10}$.

105. Способ по п.104, дополнительно включающий стадию криоконсервирования инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию ТИЛ, используя способ криоконсервирования.

106. Способ по п.105, где способ криоконсервирования осуществляется с использованием отношения собранной популяции ТИЛ к среде криоконсервирования 1:1.

107. Способ по п.102, где антиген-презентирующие клетки представляют собой мононуклеары периферической крови (РВМС).

108. Способ по п.107, где РВМС являются облученными и аллогенными.

109. Способ по п.108, где РВМС добавляют в культуру клеток в любой из дней 9-14 на Стадии (с).

110. Способ по п.102, где антиген-презентирующие клетки представляют собой искусственные антиген-презентирующие клетки.

111. Способ по п.102, где сбор на Стадии (d) осуществляется с использованием системы процессирования клеток LOVO.

112. Способ по п.62, где множество фрагментов содержит примерно 4 - примерно 50 фрагментов, где каждый фрагмент имеет объем примерно 27 мм^3 .

113. Способ по п.102, где множество фрагментов содержит примерно от 30 примерно до 60 фрагментов с общим объемом примерно от 1300 мм^3 примерно до 1500 мм^3 .

114. Способ по п.103, где множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общим объемом примерно 1350 мм^3 .

115. Способ по п.102, где множество фрагментов содержит примерно 50 фрагментов с общей массой примерно от 1 грамма примерно до 1,5 грамма.

116. Способ по п.102, где множество фрагментов содержит примерно 4 фрагмента

117. Способ по п.102, где вторая среда для культивирования клеток предусматривается в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для клеток Xuri.

118. Способ по п.102, где инфузионный мешок на Стадии (е) представляет собой инфузионный мешок, содержащий Hypothermosol.

119. Способ по п.102, где первый период на Стадии (b) и второй период на Стадии (с), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 10 дней, 11 дней или 12 дней.

120. Способ по п.102, где первый период на Стадии (b) и второй период на Стадии (с), каждый, индивидуально, осуществляются в пределах периода 11 дней.

121. Способ по п.102, где стадии (a) - (е) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 22 дня.

122. Способ по п.102, где стадии (a) - (е) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 20 дней.

123. Способ по п.102, где стадии (a) - (е) осуществляются в пределах периода примерно от 10 дней примерно до 15 дней.

124. Способ по п.102, где стадии (a) - (е) осуществляются за 22 дня или меньше.

125. Способ по п.105, где стадии (a) - (е) и криоконсервирование осуществляются за 22 дня или меньше.

126. Способ по любому из пп.102-125, где стадии (b) - (е) осуществляются в одном контейнере, где осуществление стадий (b) - (е) в одном контейнере дает в результате увеличение выхода ТП на одну резецированную опухоль по сравнению с осуществлением

стадий (b) - (e) в нескольких контейнерах.

127. Способ по любому из пп.102-126, где антиген-презентирующие клетки добавляют в ТП в ходе второго периода на Стадии (c) без открывания системы.

128. Способ по любому из пп.102-127, где третья популяция ТП на Стадии (d) представляет собой терапевтическую популяцию ТП, которая содержит повышенную субпопуляцию эффекторных Т-клеток и/или центральных Т-клеток памяти по отношению ко второй популяции ТП, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ТП, демонстрируют одну или несколько характеристик, выбранных из группы, состоящей из экспрессирования CD27+, экспрессирования CD28+, удлинения теломеров, увеличения экспрессирования CD57 и уменьшения экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

129. Способ по любому из пп.102-128, где эффекторные Т-клетки и/или центральные Т-клетки памяти, полученные в терапевтической популяции ТП, демонстрируют увеличение экспрессирования CD57 и уменьшение экспрессирования CD56 по отношению к эффекторным Т-клеткам и/или центральным Т-клеткам памяти, полученным от второй популяции клеток.

130. Способ по любому из пп.102-129, где риск микробного загрязнения уменьшается по сравнению с открытой системой.

131. Способ по любому из пп.102-130, где ТП со стадии (e) вливают пациенту.

132. Способ по любому из пп.102-131, где закрытый контейнер содержит один биореактор.

133. Способ по п.132, где закрытый контейнер содержит G-REX-10.

134. Способ по п.132, где закрытый контейнер содержит G-REX -100.

135. Способ по любому из пп.102-134, где на Стадии (d) антиген-презентирующие клетки (APC) добавляют в культуру клеток второй популяции ТП при отношении APC:ТП от 25:1 до 100:1.

136. Способ по п.135, где культура клеток имеет отношение $2,5 \times 10^9$ APC к 100×10^6 ТП.

137. Способ по любому из пп.102-134, где на Стадии (c) антиген-презентирующие клетки (APC) добавляют в культуру клеток второй популяции ТП при отношении APC:ТП от 25:1 до 100:1.

138. Способ по п.137, где культура клеток имеет отношение $2,5 \times 10^9$ APC к 100×10^6 ТП.

139. Способ по любому из пп.102-138, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

140. Способ по п.139, где редактирование генома осуществляется после того, как агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

141. Способ по п.139, где редактирование генома осуществляется до того, как

агонист 4-1BB и/или агонист OX40 вводится в среду для культивирования клеток.

142. Способ по любому из пп.102-141, где редактирование генома осуществляется на ТИЛ из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

143. Способ по любому из пп.102-141, где редактирование генома осуществляется на ТИЛ от первого размножения, или на ТИЛ от второго размножения или как того, так и другого.

144. Способ по любому из пп.102-141, где редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

145. Способ по любому из пп.102-141, где редактирование генома осуществляется до стадии (b), до стадии (c) или до стадии (d).

146. Способ по любому из пп.102-145, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения и редактирование генома осуществляется до того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

147. Способ по любому из пп.102-145, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3 в ходе первого размножения и/или в ходе второго размножения и редактирование генома осуществляется после того, как ОКТ-3 вводится в среду для культивирования клеток.

148. Способ по любому из пп.102-145, где среда для культивирования клеток содержит ОКТ-3, начиная со дня начала первого размножения, и редактирование генома осуществляется после экспонирования ТИЛ для ОКТ-3.

149. Способ по любому из пп.102-148, где редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТИЛ.

150. Способ по п.149, где указанный один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β , PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

151. Способ по п.149, где указанные один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

152. Способ по любому из пп.102-148, где редактирование генома вызывает усиление экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТИЛ, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2,

CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

153. Способ по любому из пп.102-152, где редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или одонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

154. Способ по любому из пп.102-152, где редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

155. Способ по любому из пп.102-152, где редактирование генома включает способ CRISPR.

156. Способ по п.155, где способ CRISPR представляет собой способ CRISPR/Cas9.

157. Способ по любому из пп.102-152, где редактирование генома включает способ TALE.

158. Способ по любому из пп.102-152, где редактирование генома включает цинк-пальцевый способ.

159. Популяция размножившихся ТП для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием, где популяция размножившихся ТП представляет собой третью популяцию ТП, получаемую с помощью способа, включающего:

(а) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у субъекта, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(с) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей IL-2 и, необязательно, ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 3-14 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (b) до стадии (с) осуществляется без открывания системы;

(d) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным IL-2, необязательно, ОКТ-3, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-14 дней для получения третьей популяции ТП, где третья популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (с) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(е) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (d), где переход от

стадии (d) до стадии (e) осуществляется без открывания системы;

(f) перенос собранной популяции TIL на Стадии (e) в инфузионный мешок, где переход от стадии (e) до (f) осуществляется без открывания системы;

(g) необязательное криоконсервирование инфузионного мешка, содержащего собранную популяцию TIL со стадии (f), используя способ криоконсервирования; и

(h) в любой момент времени в ходе способа, редактирование генома, по меньшей мере, части TIL.

160. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, где способ дополнительно включает один или несколько признаков, упоминаемых в любом из пп.1-158.

161. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, где среда для культивирования клеток дополнительно содержит агонист 4-1BB и/или агонист OX40 в ходе первого размножения, второго размножения или как того, так и другого.

162. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома осуществляется на TIL из одной или нескольких популяций из первой популяции, второй популяции и третьей популяции.

163. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома осуществляется на TIL от первого размножения или TIL от второго размножения, или как того, так и другого

164. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома осуществляется после первого размножения и до второго размножения.

165. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома осуществляется до стадии (c), до стадии (d) или до стадии (e)

166. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома вызывает экспрессирование одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, которые должны быть молчащими или редуцированными, по меньшей мере, в части популяции размножившихся TIL.

167. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.166, где указанные один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGFβ, PKA, CBL-B, PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, PDCD1, BTLA, CD160, TIGIT, CD96, CRTAM, LAIR1, SIGLEC7, SIGLEC9, CD244, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2 и GUCY1B3.

168. Популяция TIL для использования при лечении субъекта с раковым

заболеванием по п.166, где указанные один или несколько генов иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, TGF β и PKA.

169. Популяция ТИЛ для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.166, для которой редактирование генома вызывает улучшение экспрессирования одного или нескольких генов иммунных контрольных точек, по меньшей мере, у части терапевтической популяции ТИЛ, ген (гены) иммунных контрольных точек выбирают из группы, включающей CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, внутриклеточный домен NOTCH 1/2 (ICD) и/или лиганд NOTCH mDLL1.

170. Популяция ТИЛ для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома включает использование программируемой нуклеазы, которая медирует генерирование двухнитевого или однонитевого разрыва в указанных одном или нескольких генах иммунных контрольных точек.

171. Популяция ТИЛ для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, для которой редактирование генома включает один или несколько способов, выбранных из способа CRISPR, способа TALE, цинк-пальцевого способа и их сочетания.

172. Композиция для криоконсервирования, содержащая популяцию ТИЛ для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием по п.159, криопротекторную среду, содержащую DMSO и раствор электролита.

173. Композиция для криоконсервирования по п.172, дополнительно содержащая один или несколько стабилизаторов и один или несколько факторов роста лимфоцитов.

174. Композиция для криоконсервирования по п.173, где один или несколько стабилизаторов содержит сывороточный альбумин человека (HSA) и один или несколько факторов роста лимфоцитов содержит IL-2.

175. Композиция для криоконсервирования по п.174, где криопротекторная среда, содержащая DMSO и раствор электролита, присутствует в отношении примерно от 1,1:1 примерно до 1:1,1.

176. Композиция для криоконсервирования по п.174, содержащая популяцию ТИЛ в количестве примерно от 1×10^6 примерно до 9×10^{14} , криопротекторную среду, содержащую DMSO в количестве примерно от 30 примерно до 70 мл, раствор электролита в количестве примерно от 30 примерно до 70 мл, HSA в количестве примерно от 0,1 г примерно до 1,0 г и IL-2 в количестве примерно от 0,001 примерно до 0,005 мг.

177. Способ размножения инфильтрующих опухоль лимфоцитов (ТИЛ) в терапевтическую популяцию ТИЛ, включающий:

(а) получение первой популяции ТИЛ из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3) и их сочетаний.

178. Способ по п.177, включающий осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB, где ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB необязательно присутствует в среде для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1.

179. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, и CBLB, и их сочетания.

180. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1.

181. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования LAG-3.

182. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования TIM-3.

183. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CISH.

184. Способ по п.177 или п.178, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CBLB.

185. Способ по любому из пп.177-184, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR).

186. Способ по любому из пп.177-184, где стадия электропорообразования включает доставку системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE).

187. Способ по любому из пп.177-184, где стадия электропорообразования включает доставку цинк-пальцевой системы.

188. Способ по любому из пп.177-187, где среда для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида содержит DMSO, раствор электролита, необязательно, HSA и, необязательно, IL-2.

189. Способ лечения субъекта с раковым заболеванием, способ включает введение размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) включает:

(а) получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и, необязательно, содержащей ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB, в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (АРС), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней, для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы;

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среды для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида; и

(k) введение терапевтически эффективной дозировки собранной популяции ТП из инфузионного мешка пациенту;

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGF β R2, PRA, CBLB, BAFF (BR3), и их сочетания.

190. Способ по п.189, включающий осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB, где ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB

необязательно присутствуют в среде для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1.

191. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, и CBLB, и их сочетания.

192. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1.

193. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования LAG-3.

194. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования TIM-3.

195. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CISH.

196. Способ по п.189 или п.190, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CBLB.

197. Способ по любому из пп.189-196, где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR).

198. Способ по любому из пп.189-196, где стадия электропорообразования включает доставку системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE).

199. Способ по любому из пп.189-196, где стадия электропорообразования включает доставку цинк-пальцевой системы.

200. Способ по любому из пп.189 to 196, где среда для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида содержит DMSO, раствор электролита, необязательно, HSA и, необязательно, IL-2.

201. Популяция размножившихся ТИЛ для использования при лечении субъекта с раковым заболеванием, где популяция размножившихся ТИЛ представляет собой собранную популяцию ТИЛ, получаемую с помощью способа, включающего:

(a) получение первой популяции ТП из опухоли, резецированной у пациента, посредством переработки образца опухоли, полученного от пациента, в множество фрагментов опухоли;

(b) добавление фрагментов опухоли в замкнутую систему;

(c) осуществление первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для культивирования клеток, содержащей ИЛ-2 и необязательно, содержащей ОКТ-3 и/или антитело-агонист 4-1BB в течение примерно 2-5 дней;

(d) необязательно, добавление ОКТ-3, для получения второй популяции ТП, где первое размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость первой площади поверхности, где первое размножение осуществляется в течение примерно 1-3 дней для получения второй популяции ТП, где вторая популяция ТП, по меньшей мере, в 50 раз больше по количеству чем первая популяция ТП, и где переход от стадии (c) до стадии (d) осуществляется без открывания системы;

(e) осуществление стадии стерильного электропорообразования на второй популяции ТП, где стадия стерильного электропорообразования медирует перенос, по меньшей мере, одного редактора генома;

(f) отстаивание второй популяции ТП в течение примерно 1 дня;

(g) осуществление второго размножения посредством дополнения среды для культивирования клеток второй популяции ТП дополнительным ИЛ-2, необязательно, антителом ОКТ-3, необязательно, антителом ОХ40, антиген-презентирующими клетками (APC), для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в течение примерно 7-11 дней для получения третьей популяции ТП, где второе размножение осуществляется в закрытом контейнере, обеспечивающем газопроницаемость второй площади поверхности, и где переход от стадии (f) до стадии (g) осуществляется без открывания системы;

(h) сбор терапевтической популяции ТП, полученной на Стадии (g), для получения собранной популяции ТП, где переход от стадии (g) до стадии (h) осуществляется без открывания системы, где собранная популяция ТП представляет собой терапевтическую популяцию ТП;

(i) перенос собранной популяции ТП в инфузионный мешок, где перенос со стадии (h) до (i) осуществляется без открывания системы; и

(j) криоконсервирование собранной популяции ТП, используя среду для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида,

где стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PRA, CBLB, BAFF (BR3), и их сочетания.

202. Популяция размножившихся ТП по п.201, включающая результат первого размножения посредством культивирования первой популяции ТП в среде для

культивирования клеток, содержащей IL-2, ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB, где ОКТ-3 и антитело-агонист 4-1BB необязательно присутствуют в среде для культивирования клеток, начиная со Дня 0 или Дня 1.

203. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, и CBLB, и их сочетания.

204. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования PD-1.

205. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования LAG-3.

206. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования TIM-3.

207. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CISH.

208. Популяция размножившихся TIL по п.201 или п.202, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE) или цинк-пальцевой системы для ингибирования экспрессирования CBLB.

209. Популяция размножившихся TIL по п.201-208, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR).

210. Популяция размножившихся TIL по п.201-208, для которых стадия электропорообразования включает доставку системы эффекторов подобных активаторам транскрипции (TALE).

211. Популяция размножившихся ТП по п.201-208, для которых стадия электропорообразования включает доставку цинк-пальцевой системы.

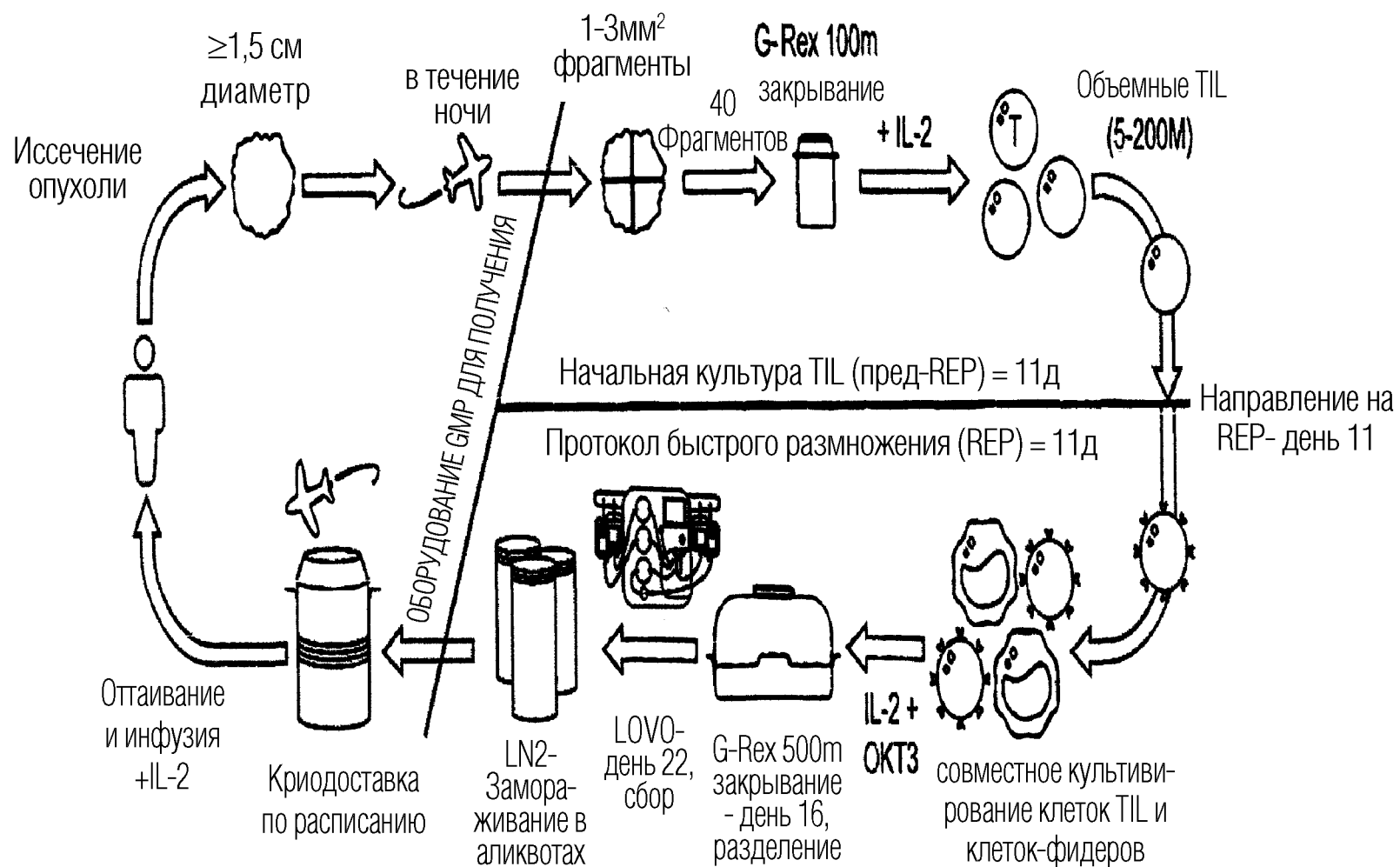
212. Популяция размножившихся ТП по п.201-211, где среда для криоконсервирования на основе диметилсульфоксида содержит DMSO, раствор электролита, необязательно, HSA, и, необязательно, IL-2.

213. Популяция размножившихся ТП по п.201-211, для которых стадия электропорообразования включает стадию импульсного электропорообразования.

214. Способ по любому из пп.1-58, где редактирование генома включает способ CRISPR и способ CRISPR включает использование высокоточного Cas9.

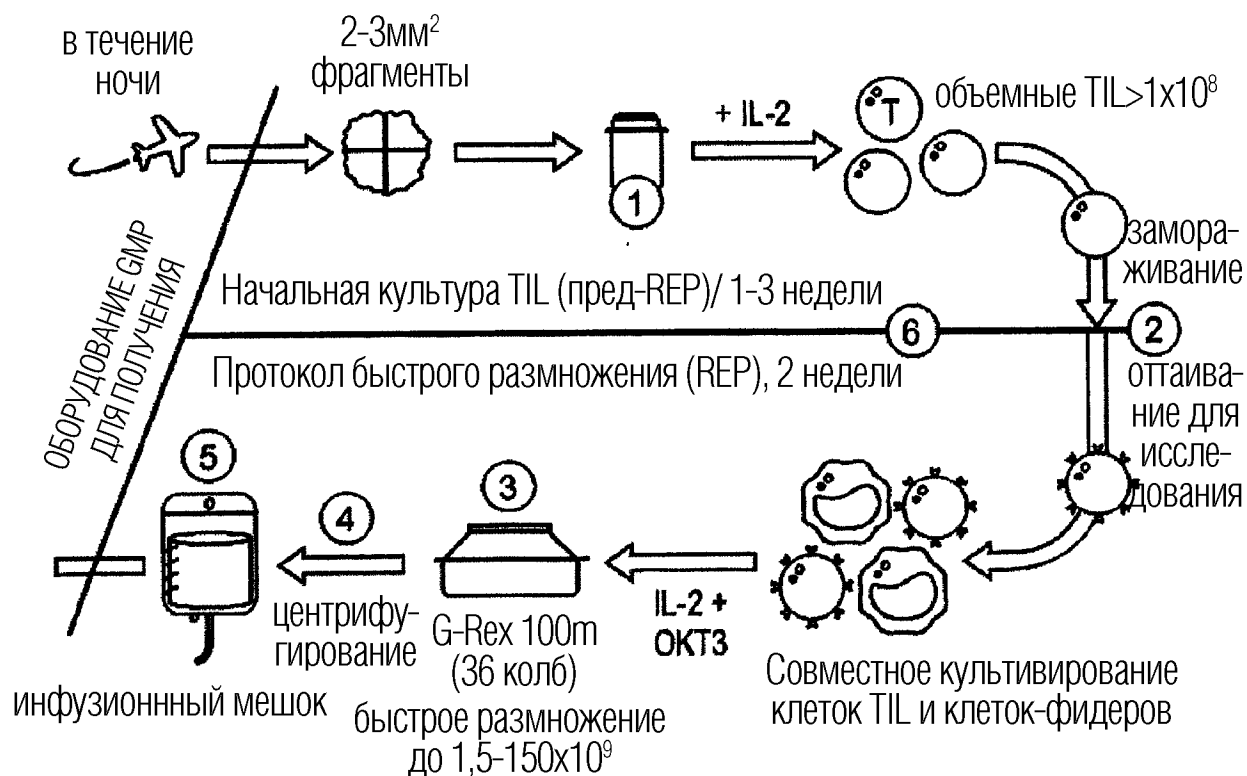
По доверенности

Процесс 2А - 22-дневный процесс, 2-3 дня, сбор/перенос



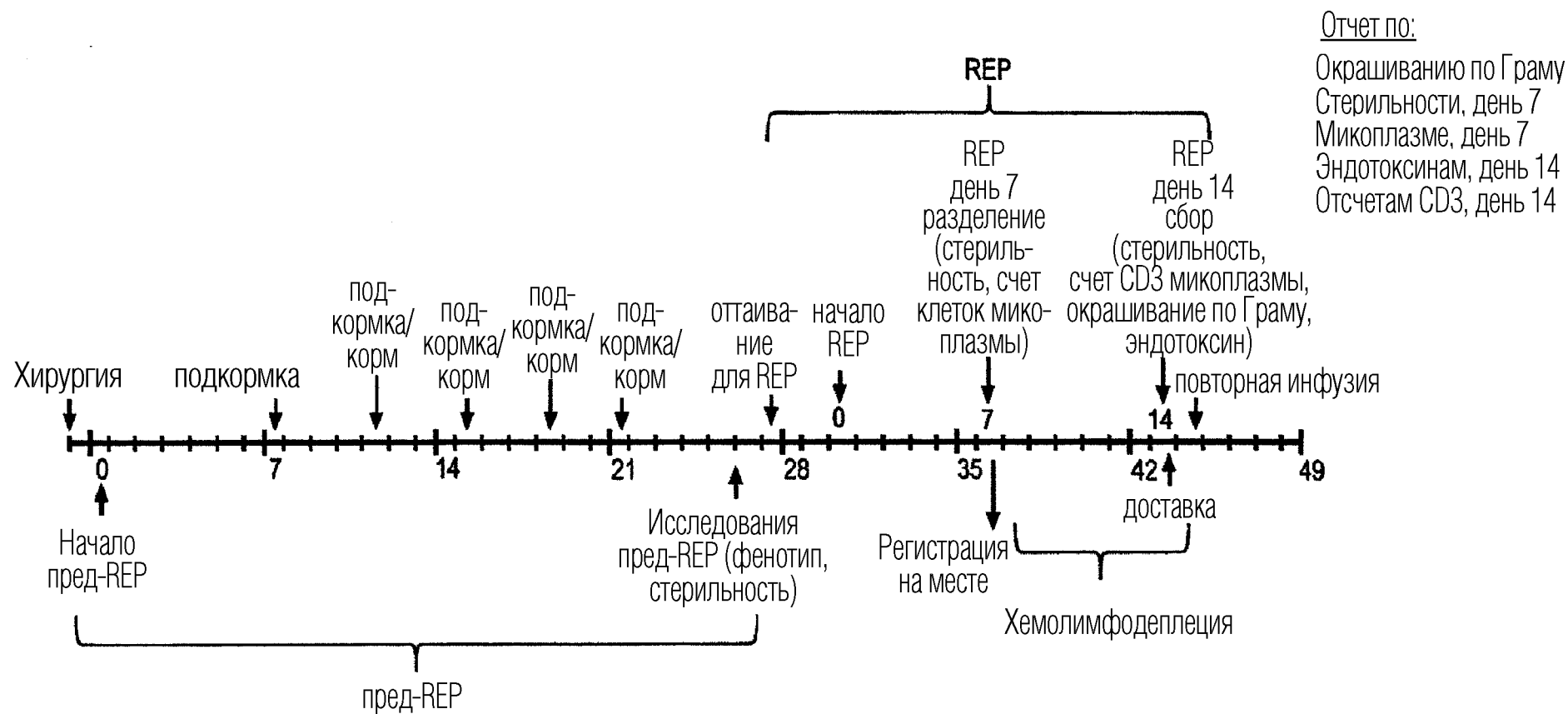
ФИГ. 1

Стадия	Современный процесс 1С	Новый процесс 2А	Воздействие
1	4 фрагмента/10 G-Rex1 0-21 день	40 фрагментов/ 1-G-Rex 100 CS-x2?) 11 дней	Увеличивает образец/ контейнер для опухоли, сокращает культивирование, сокращает стадии, подходит для замкнутой системы
2	Заморозка предREP→ исследование →оттаива- ние ~-день 27>40e6TIL	Направление на REP-день 11-<200e6	Сокращает процесс, сокращает стадии, устраняет исследования
3	36 G-Rex 100- ~день 30 >5e6TIL -разделение, день 36	4-5 G-Rex 500CS- TIL- День разделения 16	Сокращает стадии, проходит в замкнутой систем, сокращает REP
4	День сбора ~43+ Сбор посредством центрифугирования	Сбор - день 22Автоматическое устройство для промывки клеток LOVO	Сокращает стадии, автоматизируется, подходит для замкнутой системы
5	Свежий продукт- Hypothermosol-один инфузионный мешок	Криоконсервированный продукт CS10 в LN2, множество аликвот	Дает возможность для гибкой доставки, улучшения подхода к пациенту, упрощения исследования высвобождения, глобальных исследований
6	Время процесса 43+ дня	Время процесса 22 дня	Улучшает подход к пациенту, повышает производительность чистой комнаты, COG (уменьшает затраты)



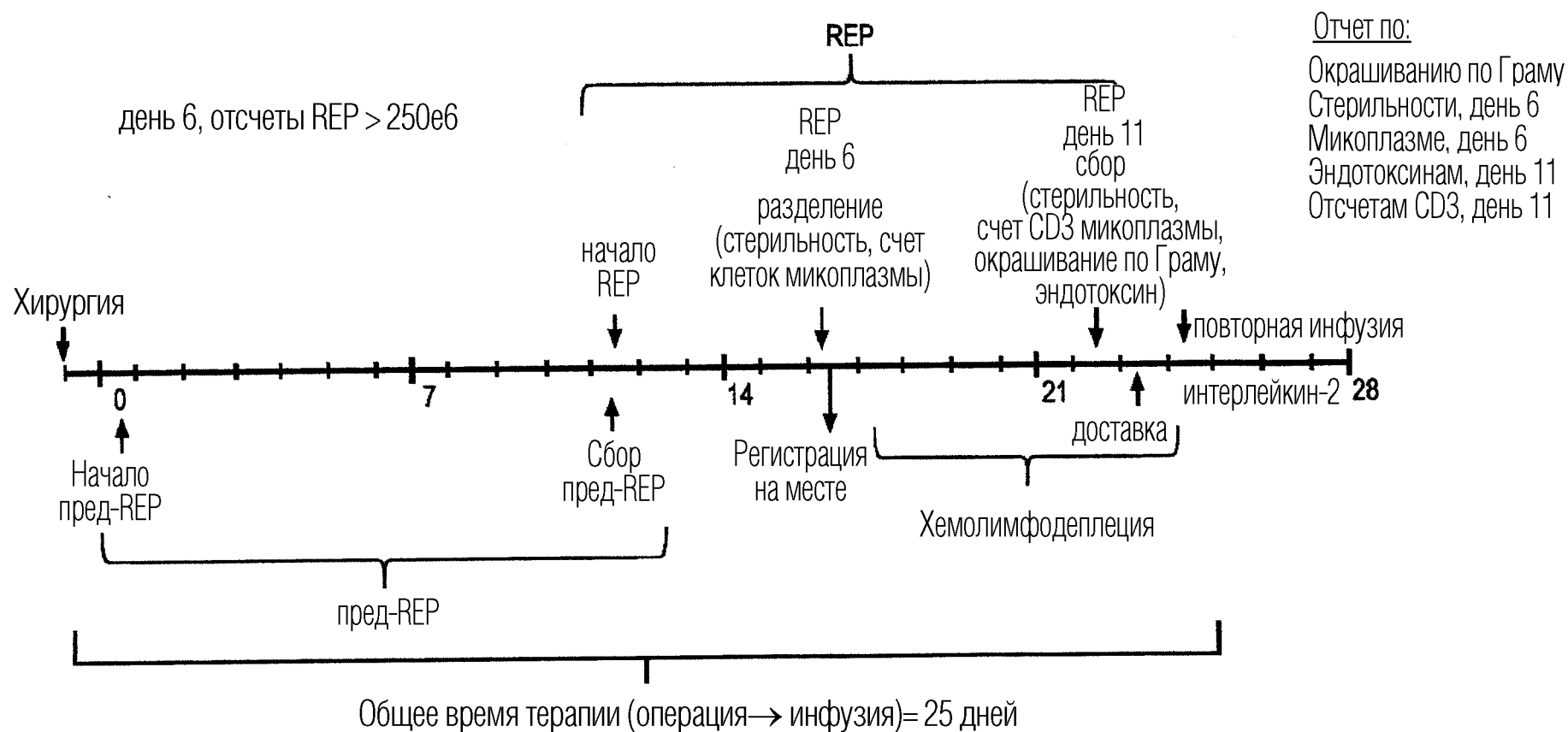
ФИГ. 2

Временной график - процесс 1С - настоящий процесс



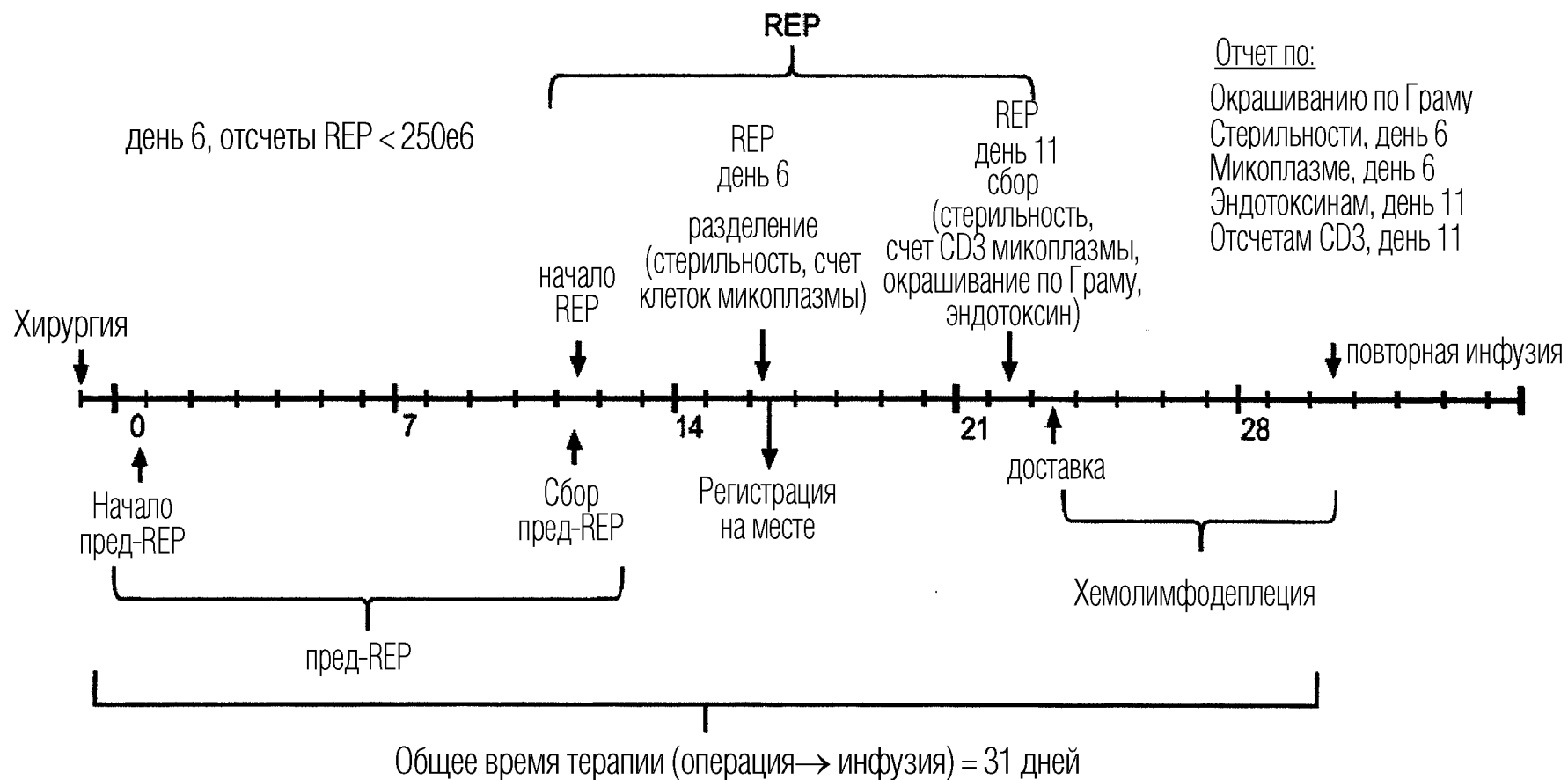
ФИГ. 3

Временной график терапии TIL -v2A-день 16 REP > 250e6

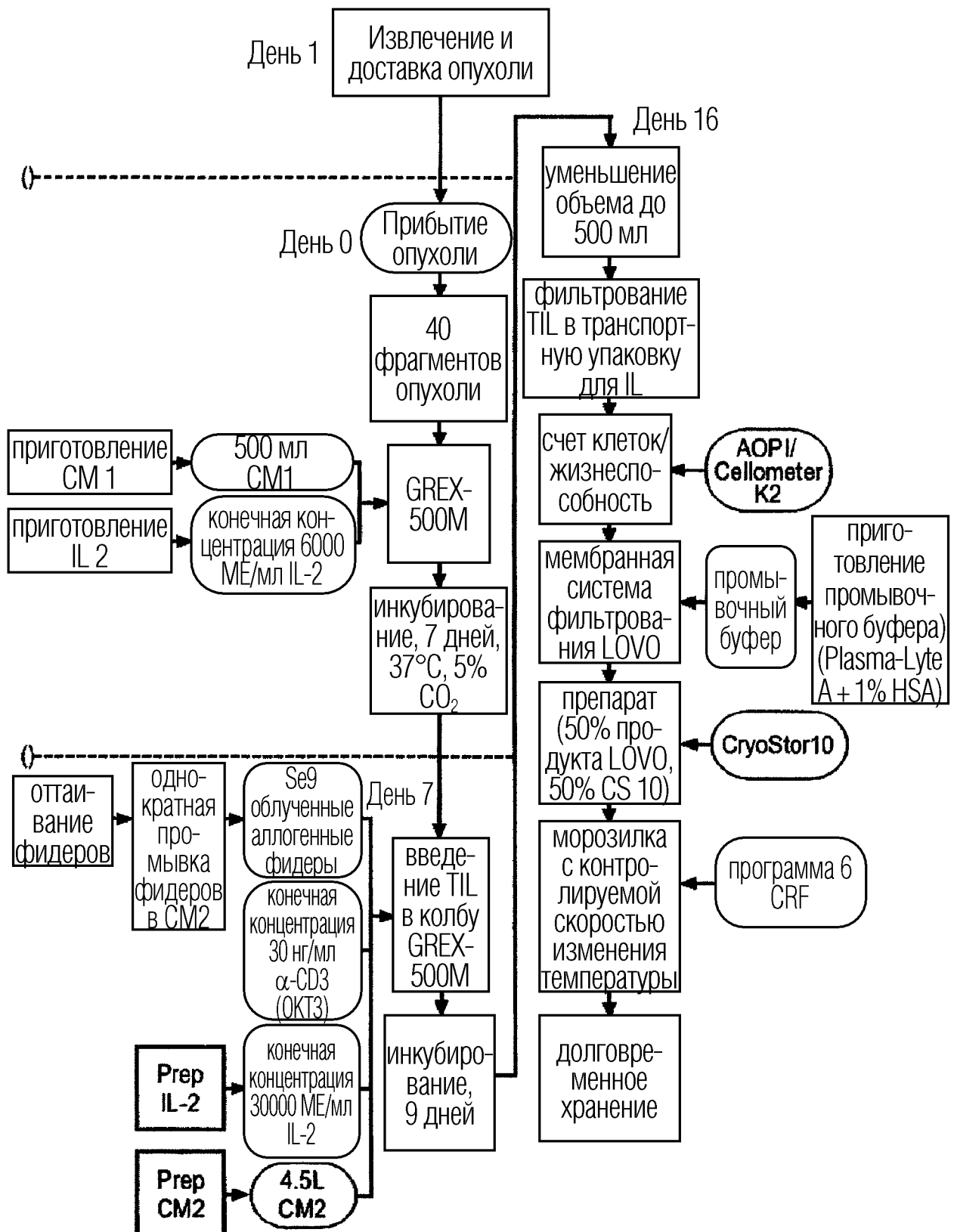


ФИГ. 4

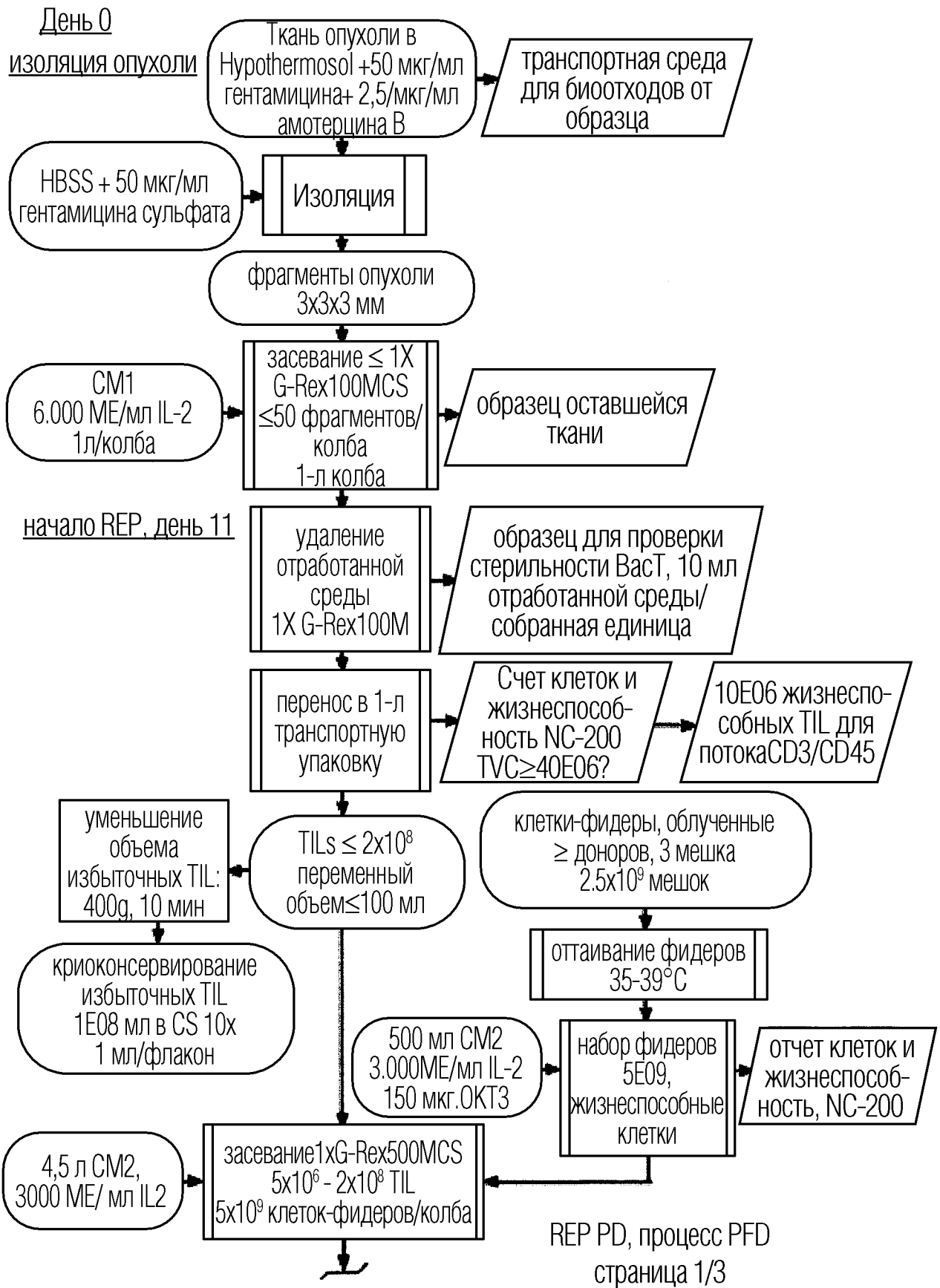
Временной график терапии TIL -v2A-день 16 REP > 250e6



ФИГ. 5



ФИГ. 6

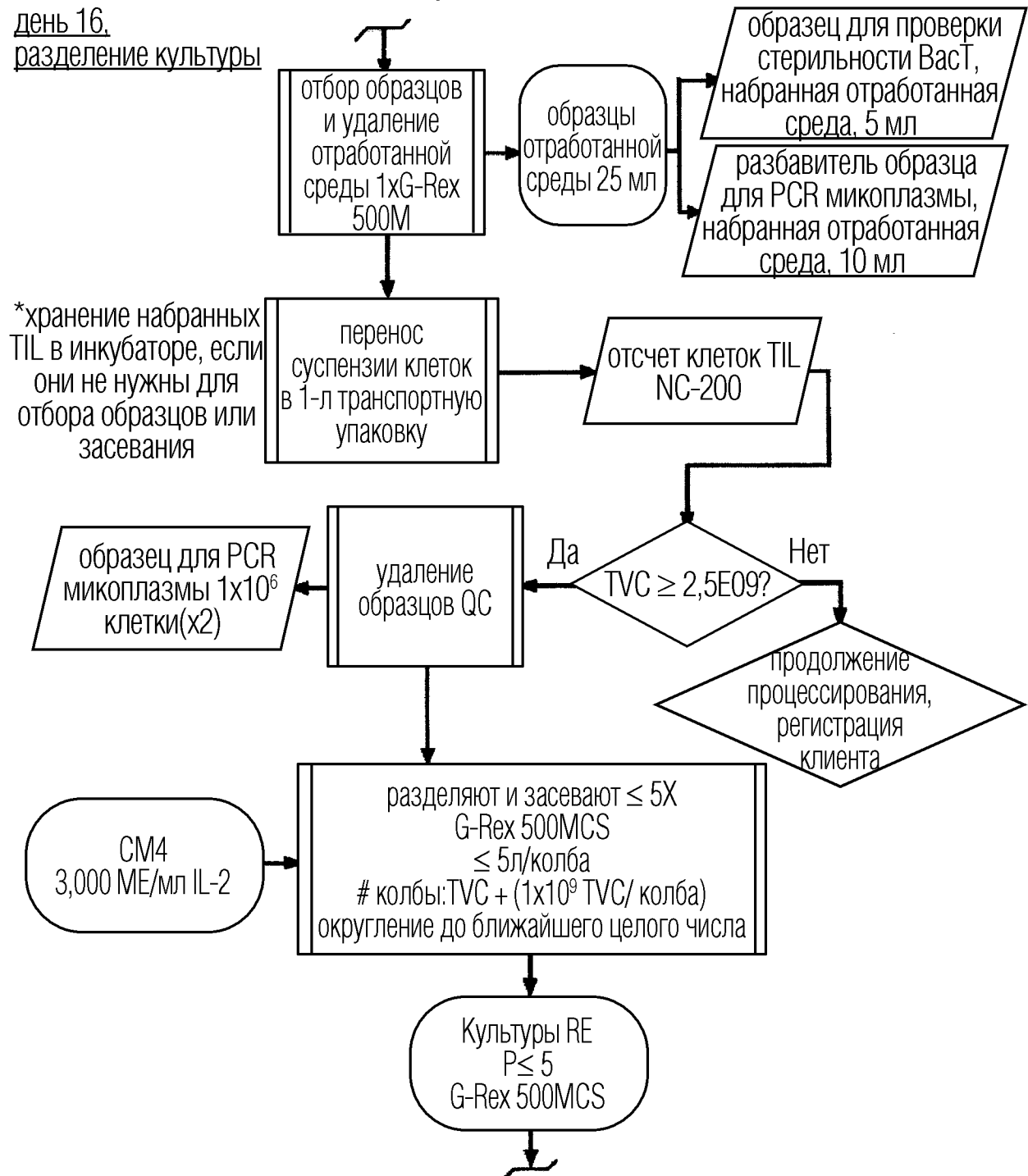


ФИГ. 7b

ФИГ. 7a

день 16.
разделение культуры

ФИГ. 7a

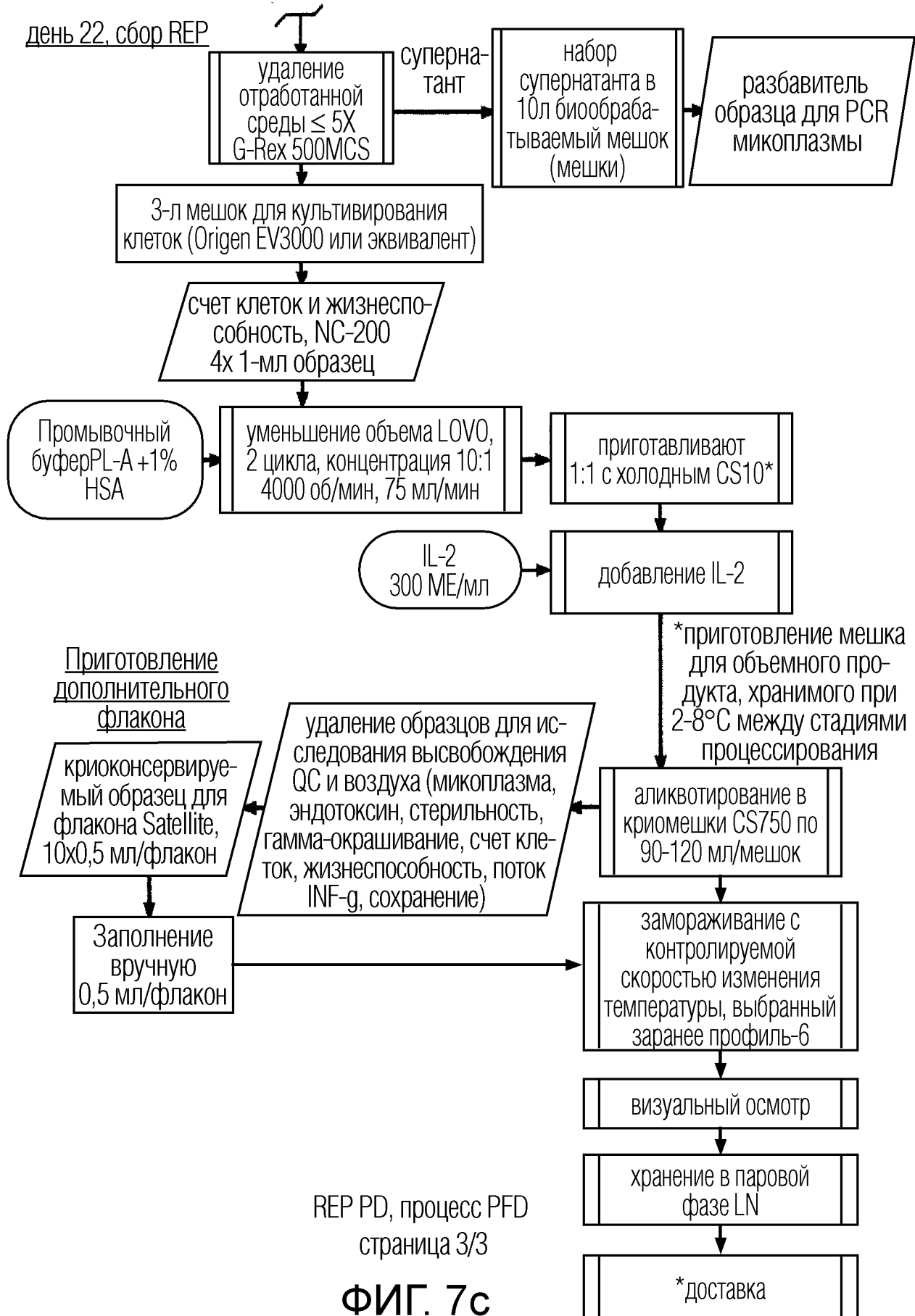


ФИГ. 7c

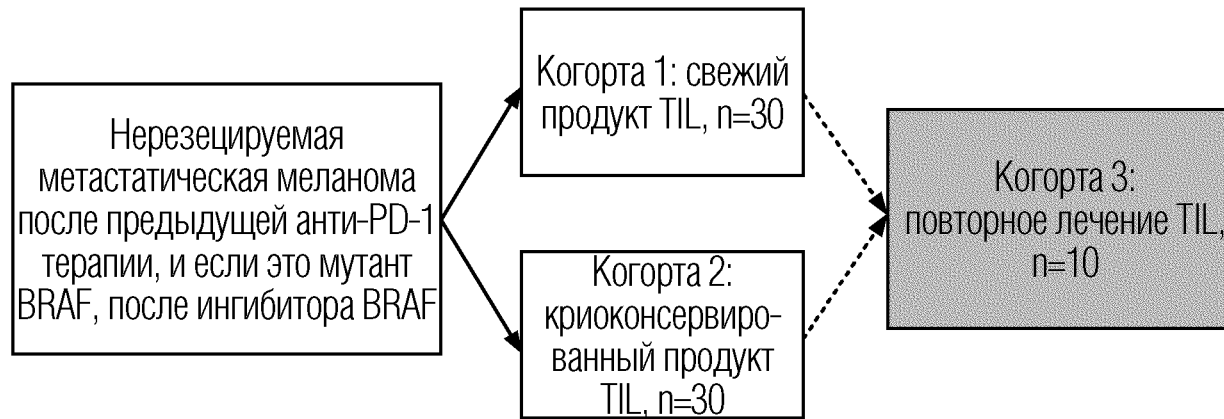
REP PD, процесс PFD
страница 2/3

ФИГ. 7b

ФИГ. 7b



ФИГ. 8



ФИГ. 9

Процесс 2А: примерно 22 дня от стадий А-Е

1. СТАДИЯ А

Получение образца опухоли у пациента

2. СТАДИЯ В

Фрагментация и первое размножение, 3-4 дня

3. СТАДИЯ С

Переход от первого размножения ко второму размножению

Без хранения и замкнутой системы

4. СТАДИЯ D

Второе размножение

IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующие клетки-фидеры

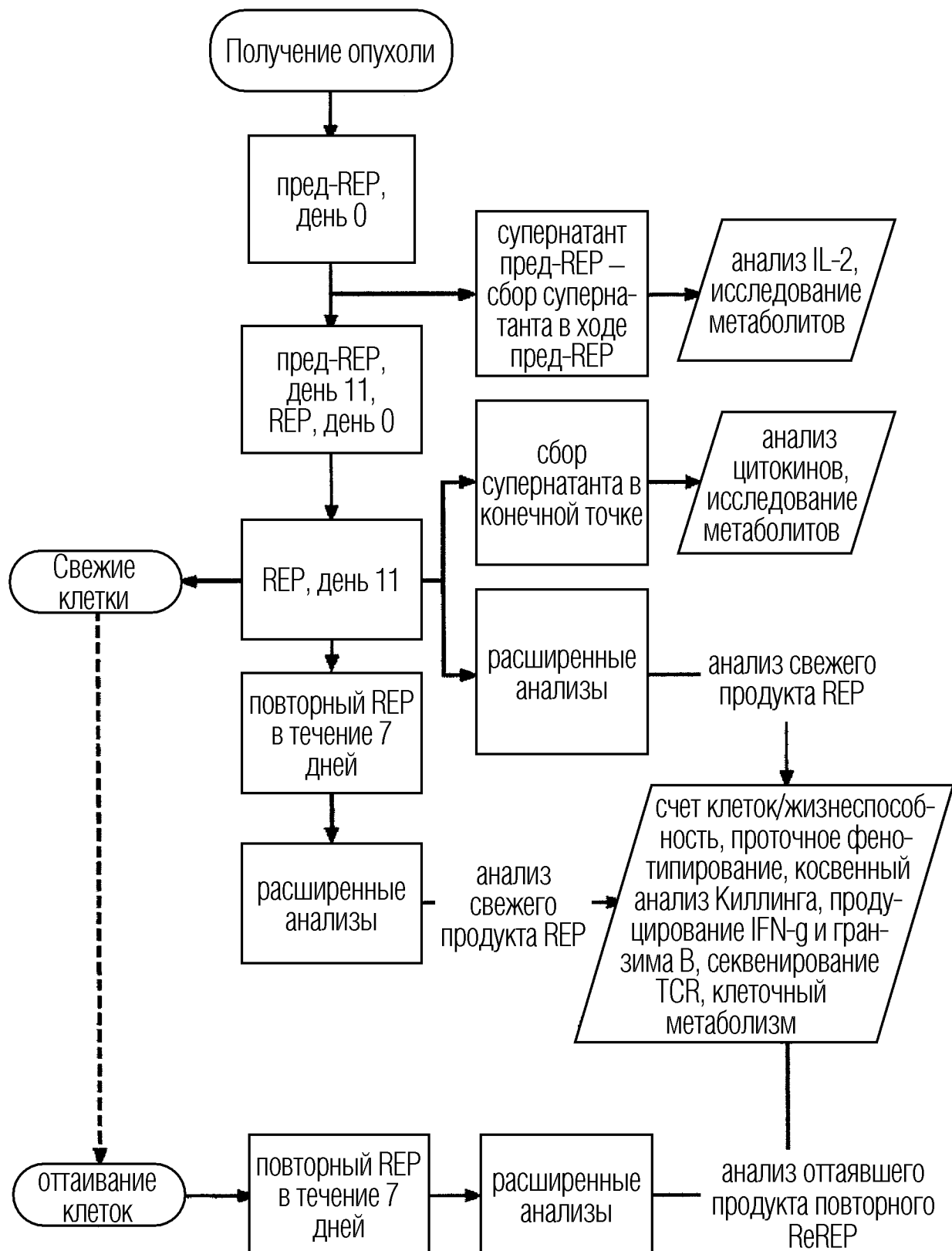
Замкнутая система

5. СТАДИЯ Е

Сбор TIL со стадии D,
замкнутая система

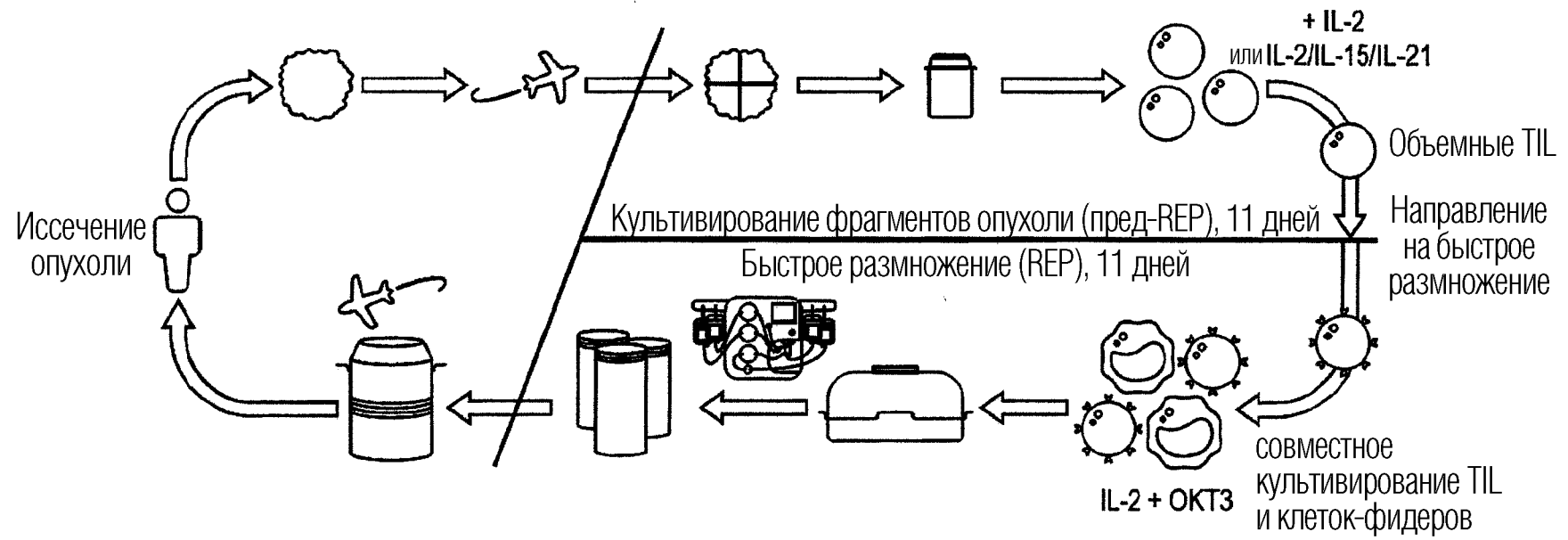
6. СТАДИЯ F

Приготовление конечного препарата
и/или перенос в инфузионный мешок
(необязательно, криоконсервирование)

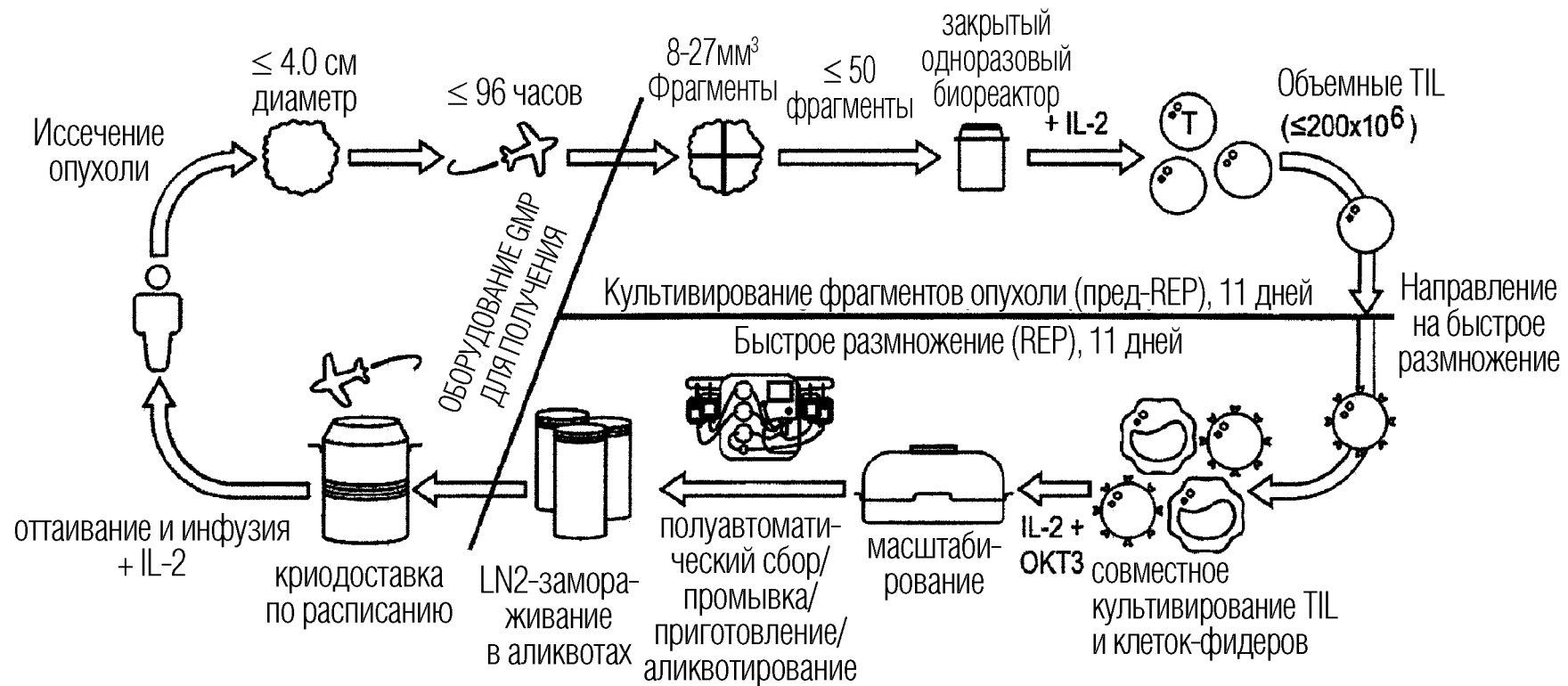


ФИГ. 10

ФИГ. 11



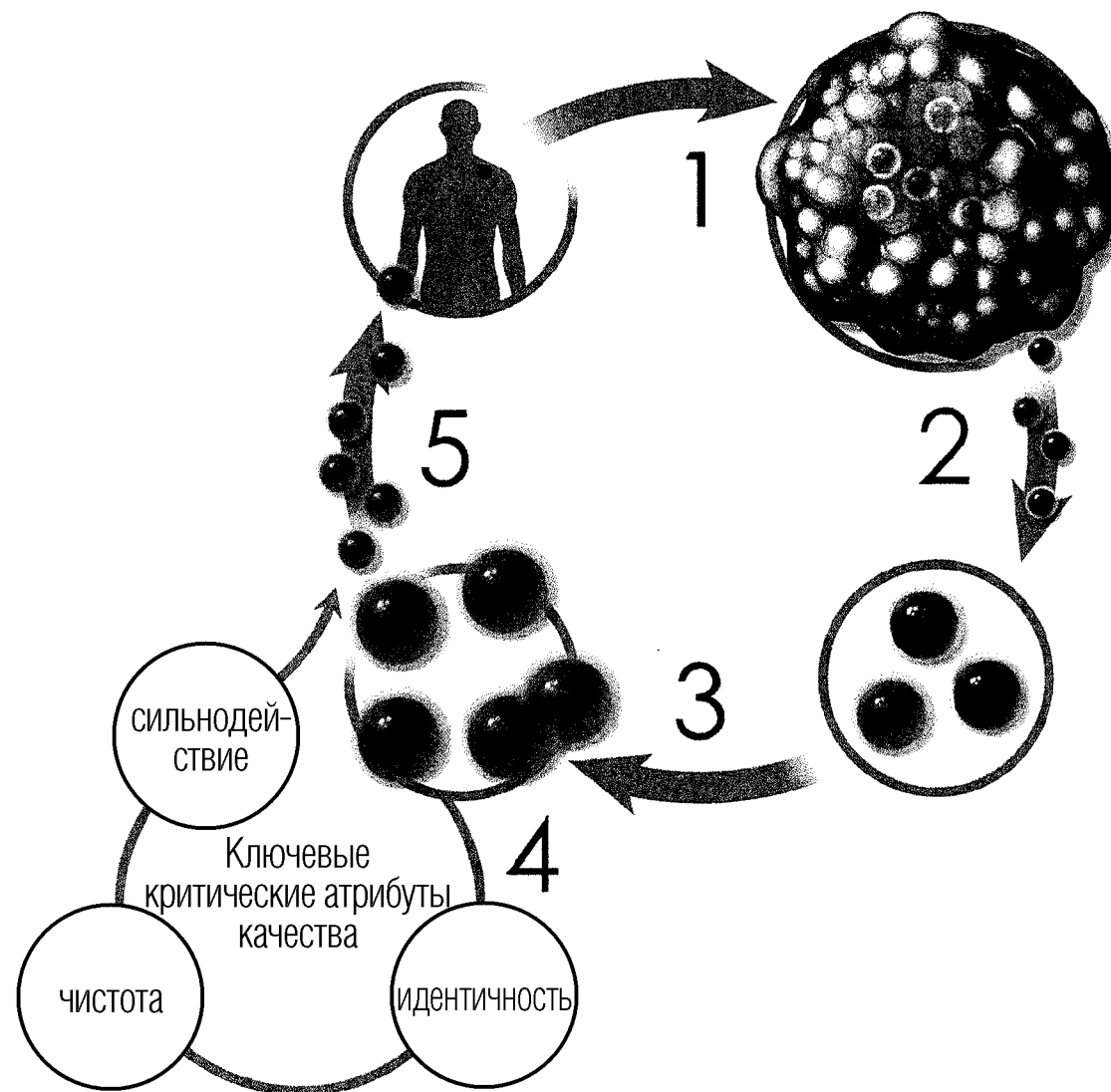
ФИГ. 12



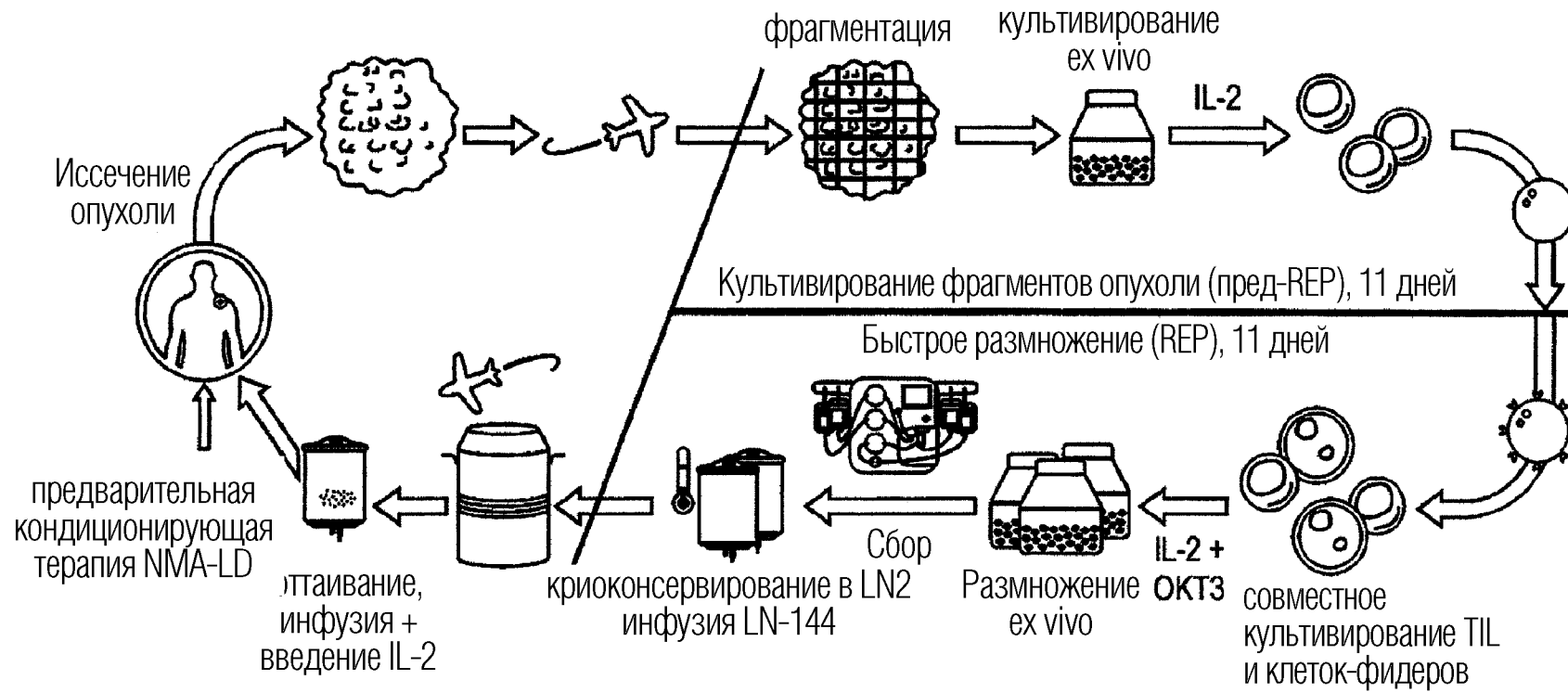
Процесс 1С: 43-55 дней для стадий А-Е	Процесс 2А: примерно 22 дня от Стадий А - Е
1. Стадия А Получение образца опухоли у пациента	2. Стадия А Получение образца опухоли у пациента
3. Стадия В Фрагментация и первое размножение 11 дней - 21 день	3. Стадия В Фрагментация и первое размножение 3 дня - 14 дней
3. Стадия С Переход от первого размножения ко второму размножению Необязательное хранение до селекции	4. Стадия С Переход от первого размножения ко второму размножению Без хранения и замкнутая система
5. Стадия D Второе размножение IL-2, ОКТ-3, антиген-презентирующих клеток-фидеров Необязательное повторение еще один или несколько раз	5. Стадия D Второе размножение IL-2, ОКТ-3 и антиген-презентирующих клеток-фидеров Замкнутая система
6. Стадия Е Сбор TIL со Стадии D	7. Стадия Е Сбор TIL со Стадии D Замкнутая система
6. Стадия F Приготовление конечного препарата и/или перенос в инфузионный мешок	8. Стадия F Приготовление конечного препарата и/или перенос в инфузионный мешок (необязательное криоконсервирование)

Стадия процесса	Вариант осуществления Процесса 1C	Вариант осуществления Процесса 2A	Преимущества
Пред-REP	• 4 фрагмента на 10 колб GREX-10 • продолжительность 11-21 день	• 40 фрагментов на 1 колбу GREX-100M • продолжительность 11 дней	• Увеличение количества фрагментов опухоли на одну колбу • Сокращение времени культивирования • Сокращение стадий • Возможность использования в замкнутой системе
Переход от пред-REP к REP	• TIL от пред-REP замораживают до фенотипирования для селекции, затем оттаивают для перехода к REP (день 30) • REP требует $>40 \times 10^6$ TIL	• TIL от пред-REP прямо переходят к REP, в день 11 • REP требует $25-200 \times 10^6$ TIL	• Сокращение процесса пред-REP- -REP • Уменьшение количества стадий • Устраняется селекция с фенотипированием • Можно использовать в замкнутой системе
REP	• 6 колб GREX-100M в день 0 REP • 5×10^6 TIL и 5×10^8 клеток-фидеров PBMC на одну колбу в день 0 REP • Разделяют на 18-36 колбы в день 7 REP • продолжительность 14 дней	• 1 колб GREX-500M в день 11 • $25-200 \times 10^6$ TIL и 5×10^9 клеток-фидеров PBMC в день 11 • Разделяют на $\times 6$ колб GREX-500M в день 16 • продолжительность 11 дней	• Уменьшение количества стадий • Сокращение продолжительности REP • Перенос TIL между колбами в замкнутой системе • Замена сред в замкнутой системе
Сбор	• Сбор TIL центрифугированием	Сбор TIL с помощью автоматической системы промывки клеток LOVO	• Сокращение стадий • Автоматическая промывка клеток • Замкнутая система • Уменьшение потерь продукта при промывке
Конечный препарат	• Свежий продукт в Hypothermosol • Один инфузионный мешок • Ограниченная стабильность доставки	• Криоконсервированный продукт в PlasmaLyte-A + 1% HSA и CS10 хранится в LN2 • Множеств аликвот • более продолжительная стабильность доставки	• Гибкость доставки • Гибкое расписание для пациента • Более своевременное исследование высвобождения
Общее оцениваемое время процесса	• 43-55 дней	• 22 дня	• Более быстрый подход к пациенту

ФИГ. 15



ФИГ. 16

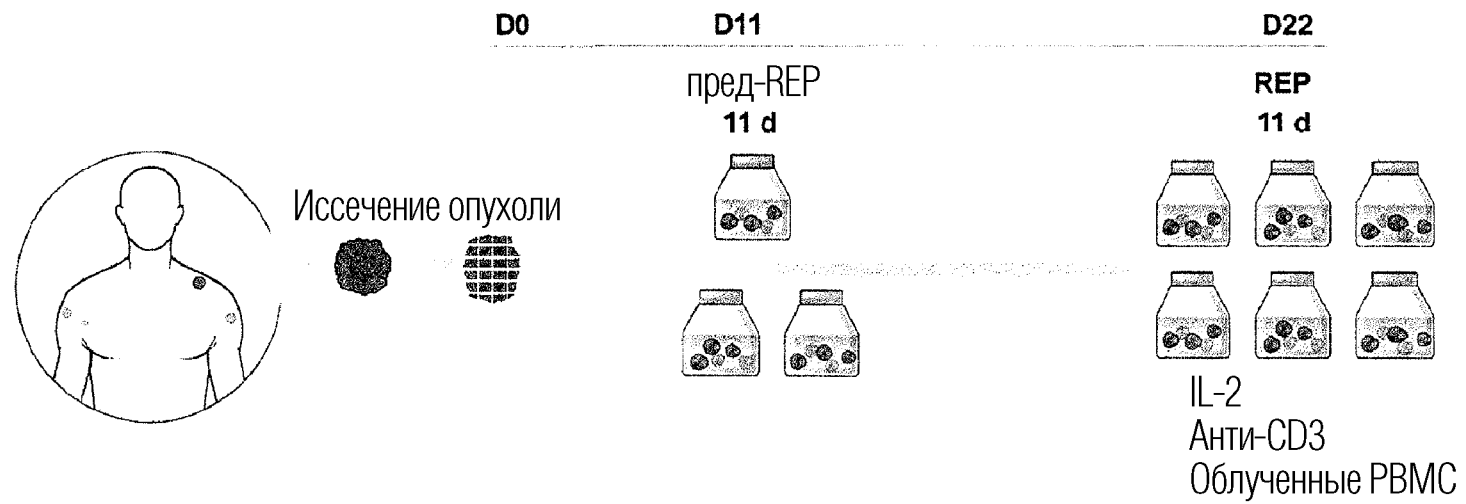


СТАДИЯ СПОСОБА	GEN 1	GEN 2	ВОЗДЕЙСТВИЕ
Культивирование фрагментов	≤21 дня, множество биореакторов, множество вмешательств оператора	≤11 дней, один замкнутый биореактор, без вмешательств	Сокращает культивирование, уменьшает количество вмешательств
Селекция TIL	TIL размноженные с IL-2, криоконсервируют, исследуют, селекция основана на фенотипе, оттаивают, отстаивают, совместно культивируют	Направляют объемные TIL на совместное культивирование	Сокращение стадий, уменьшение количества исследований, повышение клонального разнообразия
Сбор/промывка	Уменьшение объема и сбор вручную. Промывка и концентрирование вручную	Полуавтоматическое уменьшение замкнутого объема и сбор. Автоматическая промывка и концентрирование	Уменьшение количеств вмешательств оператора, уменьшение времени процессирования, поддержание функционально замкнутой системы
Препарат	Свежий гипотермический продукт (2-8°C)	Криоконсервированный продукт (≤-150°C)	Возможность глобальных исследований, благодаря повышению гибкости доставки и расписания для пациента
Время получения	время процесса 38 дней	Время процесса 22 дня	Подход к пациенту, производительность чистой комнаты, понижение стоимости товаров

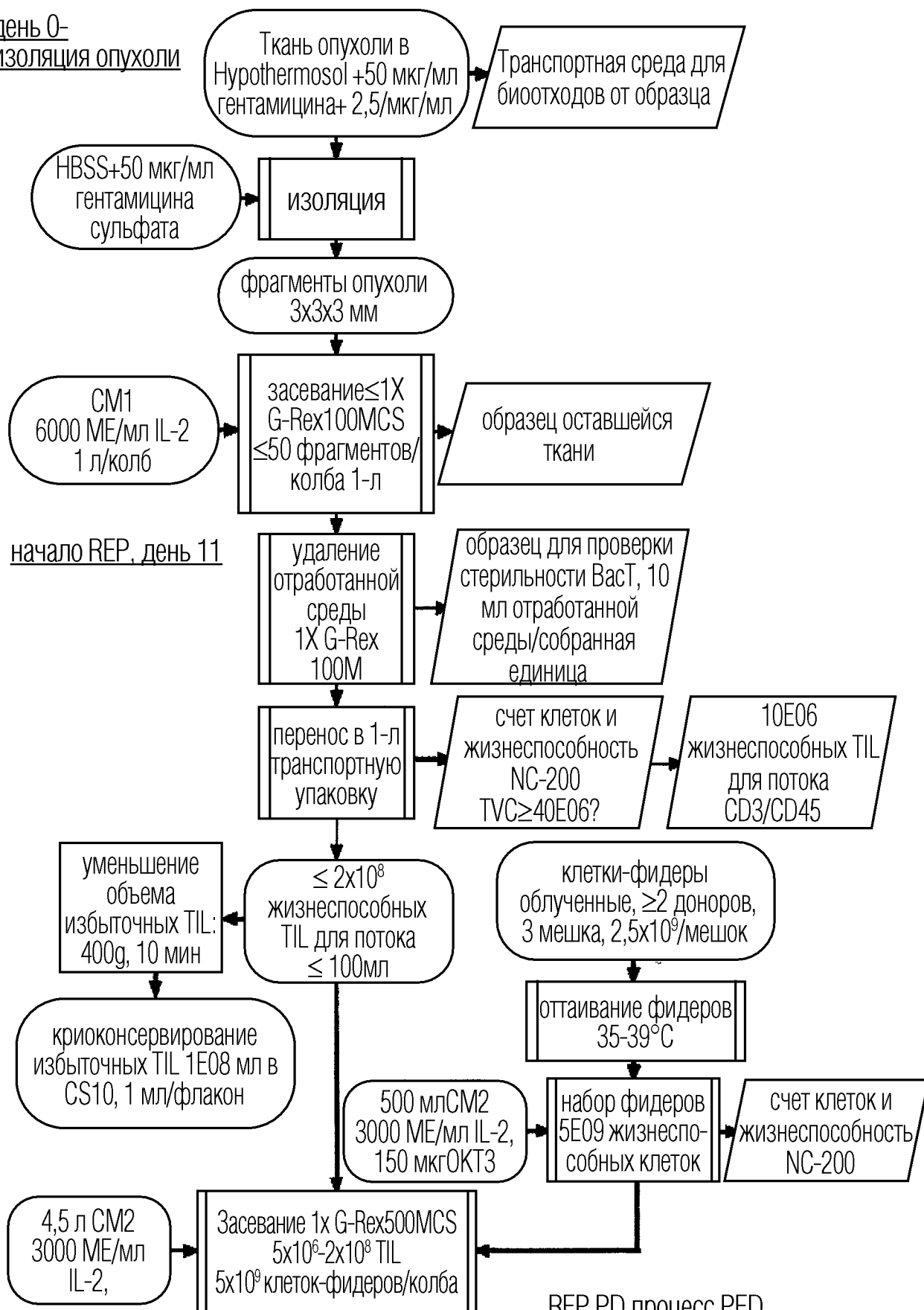
19/26

ФИГ. 17

ФИГ. 18

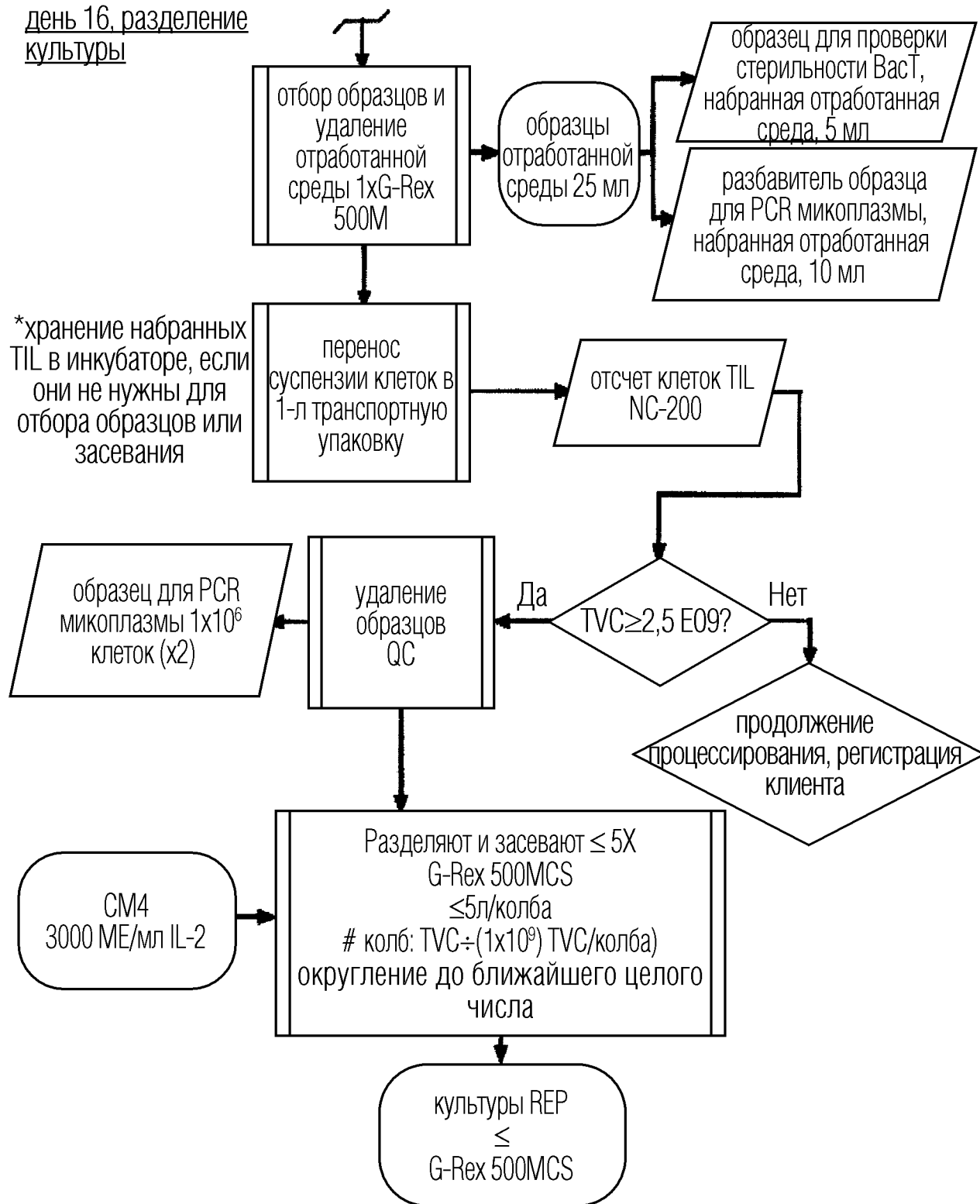


день 0-
изоляция опухоли



день 16, разделение
культуры

ФИГ. 19a

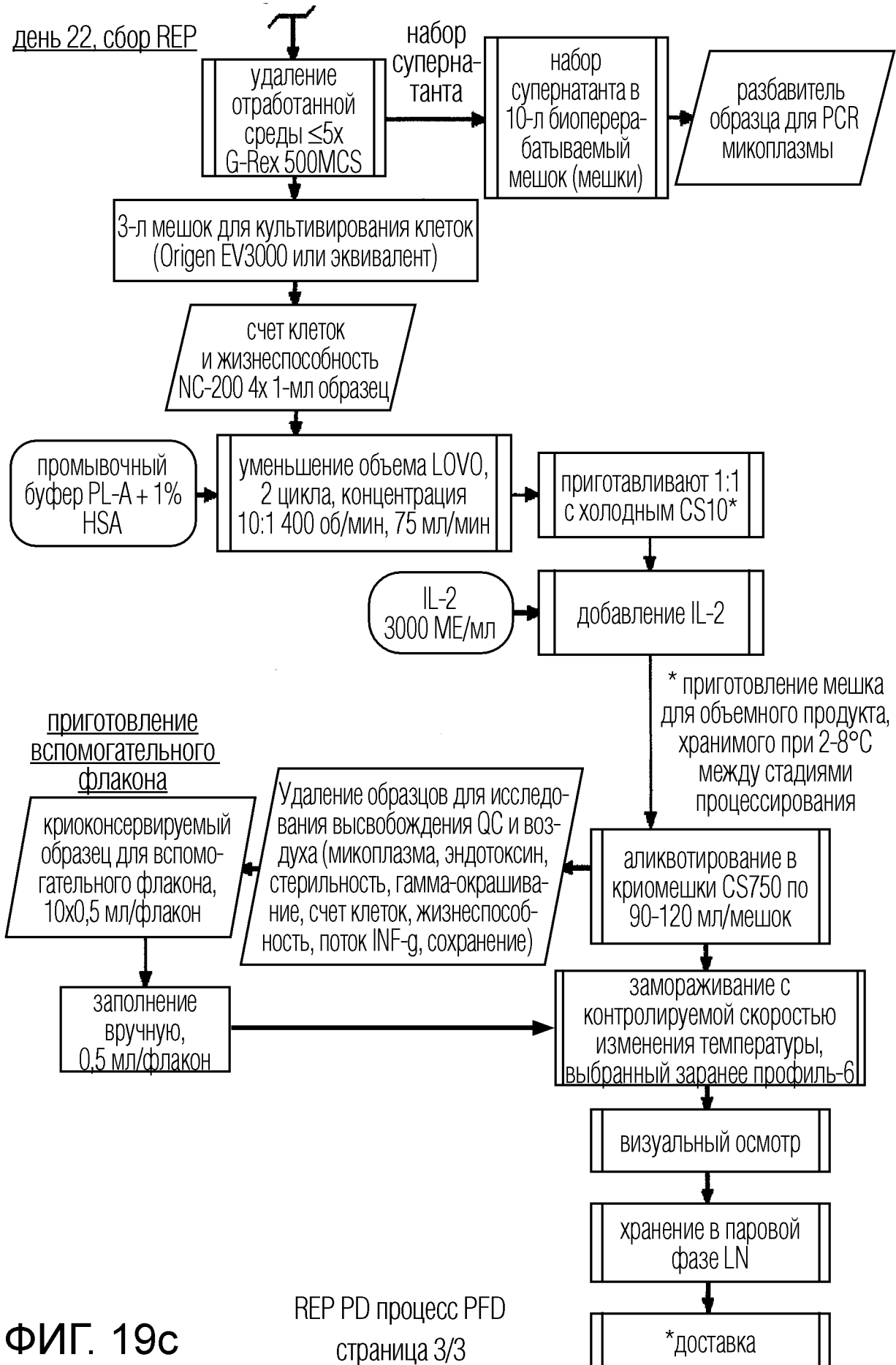


ФИГ. 19c

REP PD процесс PFD
страница 2/3

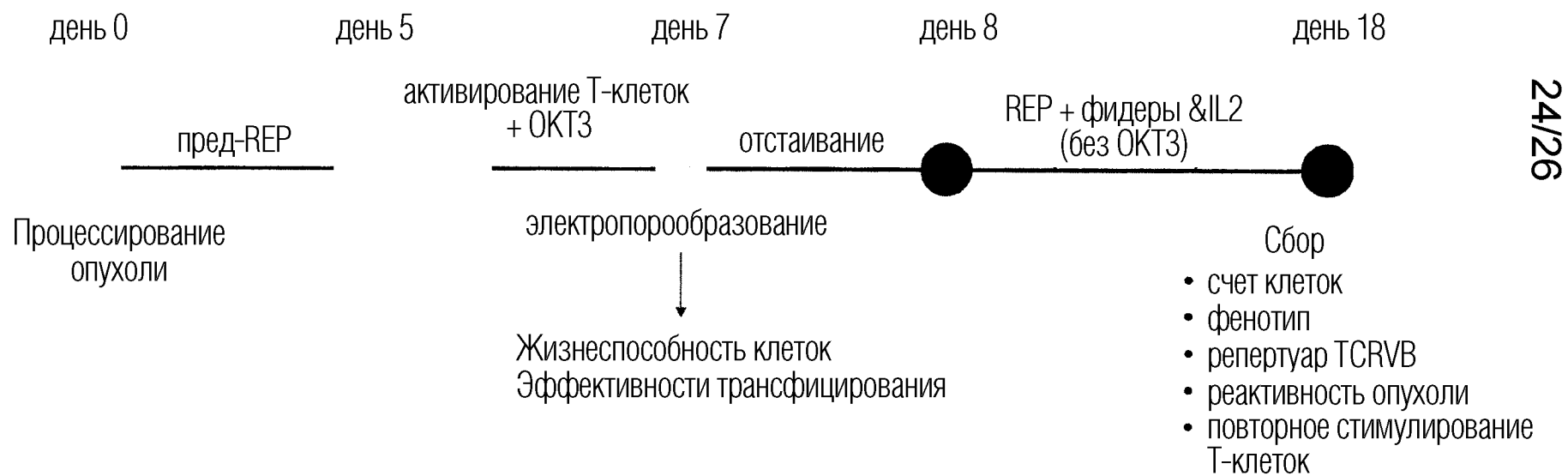
ФИГ. 19b

ФИГ. 19b

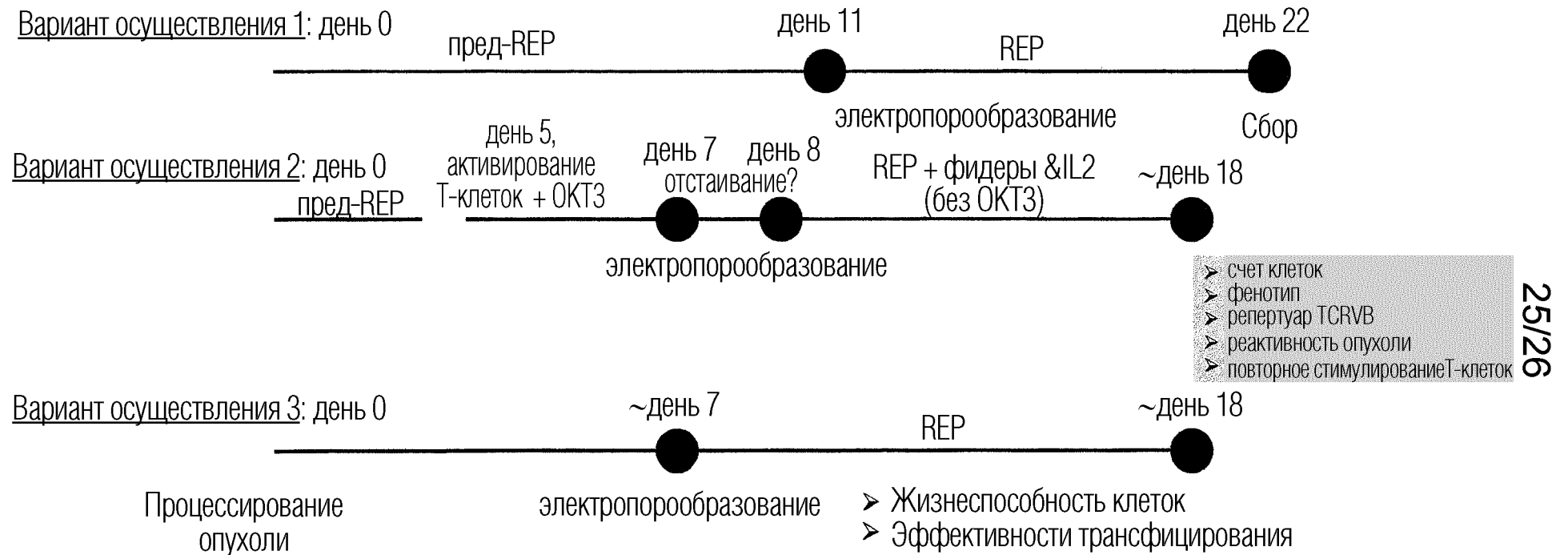


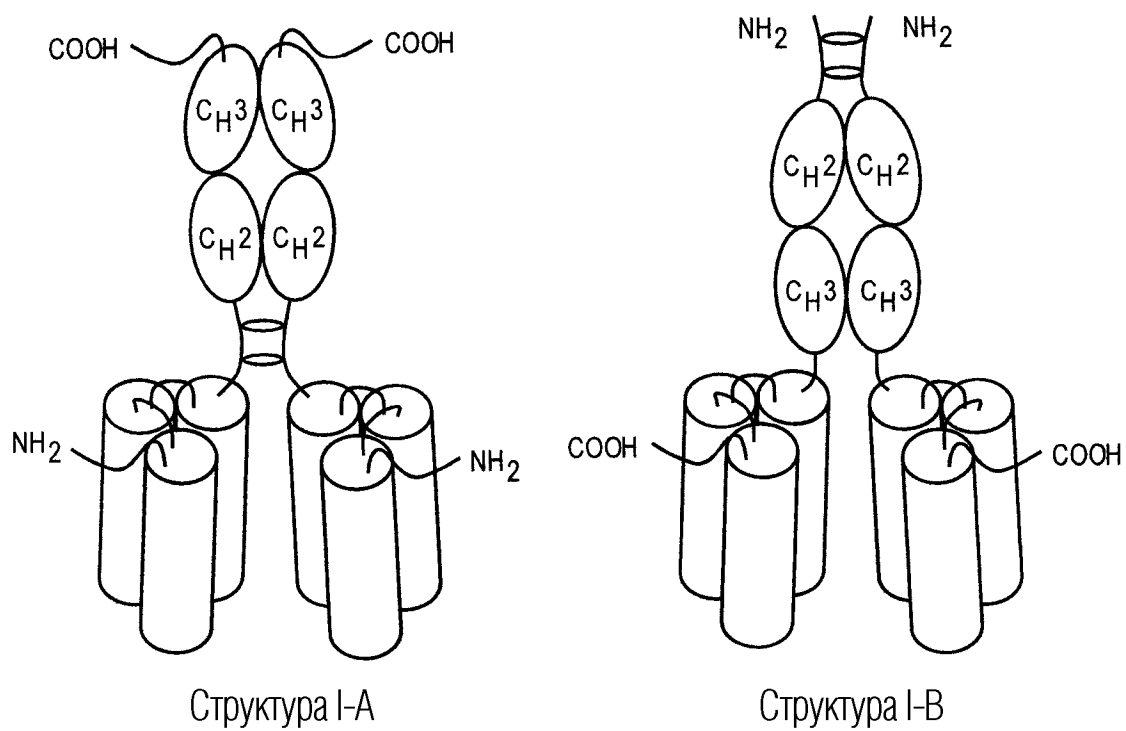
ФИГ. 19с

ФИГ. 20

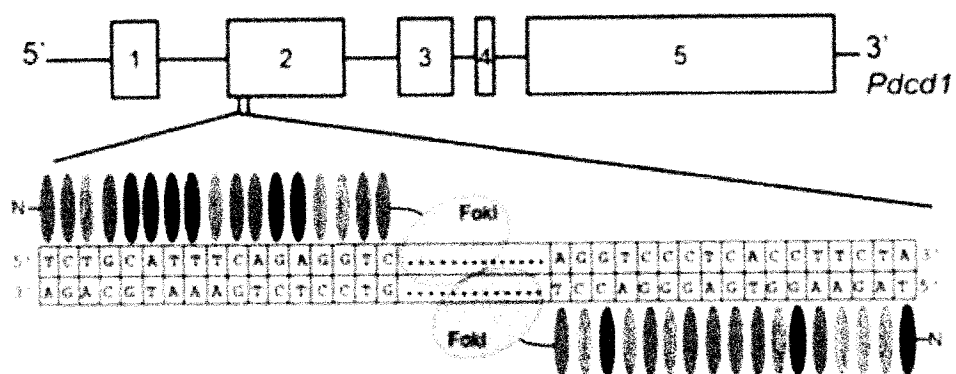


ФИГ. 21





ФИГ. 22



ФИГ. 23