(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191275 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.09.23

(22) Дата подачи заявки
2019.11.04

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

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНФИЛЬТРУЮЩИХ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТОВ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ

(31) **62/755,954; 62/903,585**
(32) **2018.11.05; 2019.09.20**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/059718**
(87) **WO 2020/096988 2020.05.14**
(88) **2020.06.18**

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

(72) Изобретатель:
Уорделл Сет, Морено Марица Лиенлаф (US)

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

(57) Согласно настоящему изобретению предложены усовершенствованные и/или сокращенные способы размножения TIL и получения терапевтических популяций TIL, в том числе новые способы размножения популяций TIL в закрытой системе, которые обеспечивают повышенную эффективность, усовершенствованный фенотип и улучшенное метаболическое здоровье TIL, за меньший период времени, при сниженной микробной контаминации, а также меньшей стоимости. Такие TIL находят применение в схемах терапевтического лечения.

Способ 2A: около 22 дней после этапов A-E	Способ GEN 3: около 14-18 дней после этапов A-E
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (необязательное замораживание перед этапом B; необязательно образец опухоли получен путем трепанобиопсии/малой биопсии)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (необязательное замораживание перед этапом B)
ЭТАП B Первое размножение (физическая фрагментация с получением по меньшей мере по 40 фрагментов на контейнер с культивированием в течение примерно 3-14 дней со средой, содержащей ИЛ-2)	**ЭТАП B** (Подготовительное первое размножение физическая фрагментация с получением до 60 фрагментов на контейнер с культивированием в течение примерно 1-7/8 дней со средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие фидерные клетки)
ЭТАП C Переход от первого размножения к второму размножению (С этапа B TIL непосредственно переводят на этап D, необязательно на 11 день этапа B)	**ЭТАП C** Переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению (С этапа B TIL непосредственно переводят на этап D на 7/8 день)
ЭТАП D Второе размножение (TIL, культивированные в ростовой среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки в закрытом контейнере)	**ЭТАП D** Быстрое второе размножение (TIL, культивированные в ростовой среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и 2x антигенпрезентирующих фидерных клеток; На 10-11 дни масштабирование и добавление дополнительного ИЛ-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D (TIL, собранные из закрытой системы)	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Получение итогового состава и/или перенос в пакет для инфузии (с необязательной криоконсервацией)	**ЭТАП F** Получение итогового состава и/или перенос в пакет для инфузии (с необязательной криоконсервацией)

202191275 A1

202191275 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-568787EA/055

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ИНФИЛЬТРУЮЩИХ ОПУХОЛИ ЛИМФОЦИТОВ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОТЕРАПИИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 62/775954, поданной 5 ноября 2018 г., и предварительной заявки на патент США № 62/903585, поданной 20 сентября 2019 г., которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Лечение массивного рефрактерного рака с применением адаптивного переноса лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль (TIL), представляет собой эффективный терапевтический подход для пациентов с плохим прогнозом. Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. **2006,** 6, 383-393. Для успешной иммунотерапии требуется значительное число TIL, а для коммерциализации необходим стабильный и надежный процесс. Вышеуказанное было труднодостижимым ввиду технических, логистических и правовых проблем, связанных с размножением клеток. Размножение TIL на основе ИЛ-2 с последующим применением «процесса быстрого размножения» («rapid expansion process», REP) стал предпочтительным способом размножения TIL из-за 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 приводить к 1000-кратному размножению TIL в течение периода 14 дней, хотя для этого требуется значительный избыток (*например,* 200-кратное количество) облученных аллогенных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК, также известных как мононуклеарные клетки (МНК)), часто от нескольких доноров, в качестве фидерных клеток, а также антитело против CD3 (OKT3) и высокие дозы ИЛ-2. Dudley, et al., J. Immunother. **2003,** 26, 332-42. TIL, прошедшие через процедуру REP, обеспечивали успешную адоптивную клеточную терапию после иммуносупрессии у хозяев-пациентов с меланомой. Существующие параметры приемлемости для инфузии основаны на регистрируемых показателях состава TIL (*например,* положительных пробах на CD28, CD8 или CD4) и на кратности размножения и жизнеспособности продукта REP.

[0003] Существующие способы получения TIL ограничены проблемами продолжительности, стоимости, стерильности, а также другими факторами, описанными в настоящем документе. Существует насущная потребность в способах получения TIL и терапии на основе таких способов, характеризующихся повышенной экономической целесообразностью и масштабируемостью при получении, а также более эффективными противораковыми фенотипами составов с TIL, продуцируемых для лечения пациентов-людей в многочисленных клинических центрах. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, обеспечивая новый процесс для размножения TIL, который включает

антигенпрезентирующие фидерные клетки с момента инициации размножения для подготовки TIL к размножению вместо традиционного этапа pre-REP размножения, что позволяет существенно сократить общую продолжительность процесса размножения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] Согласно настоящему изобретению предложены усовершенствованные и/или более быстрые способы размножения TIL и получения терапевтических популяций TIL.

[0005] Согласно настоящему изобретению предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) взятие и/или получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(b) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем количество клеток в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(c) осуществление быстрого второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, отличающееся тем, что число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раз больше числа АПК, добавленного на этапе (b), при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, при этом указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область;

(d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c); и

(e) перенос собранной популяции TIL с этапа (d) в пакет для инфузии.

[0006] Согласно настоящему изобретению предложен способ A размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

взятие и/или получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c).

[0007] Согласно некоторым вариантам реализации «взятие» указывает на то, что TIL, используемые в способе и/или процессе, могут быть извлечены непосредственно из образца (в том числе полученного путем хирургической резекции, игольной биопсии, трепанобиопсии, малой биопсии, или другого образца) в ходе осуществления этапов способа и/или процесса. Согласно некоторым вариантам реализации «получение» указывает на то, что TIL, используемые в способе и/или процессе, могут быть непрямо извлечены из образца (в том числе полученного путем хирургической резекции, игольной биопсии, трепанобиопсии, малой биопсии, или другого образца) и затем использованы в способе и/или процессе (например, в том случае, если этап (a) начинается, когда TIL уже были извлечены из образца посредством отдельного процесса, не включенного в часть (a), такие TIL могут быть названы «полученными»).

[0008] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (b) клеточная культуральная среда дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), при этом число АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем число АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0009] Согласно настоящему изобретению предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, причем указанная первая популяция TIL может быть получена путем переработки образца опухоли из опухоли, резецированной у субъекта, во множество фрагментов опухоли, в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, причем указанное подготовительное первое размножение

осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL выше, чем в первой популяции TIL;

(b) осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с клеточной культуральной средой для второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК при быстром втором размножении по меньшей мере в два раза больше числа АПК на этапе (a), причем указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, при этом указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область; и

(c) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (b).

[0010] Настоящее изобретение также обеспечивает способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(b) осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

(c) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (b).

[0011] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (a) клеточная культуральная среда дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и при этом число АПК в культуральной среде на этапе (c) больше, чем число АПК в культуральной среде на этапе (b).

[0012] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 20:1.

[0013] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом

размножении находится в диапазоне от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 10:1.

[0014] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 5:1.

[0015] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 3:1.

[0016] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении составляет приблизительно 2:1.

[0017] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно $1,0 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $4,5 \times 10^6$ АПК/см^2, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно $2,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $7,5 \times 10^6$ АПК/см^2.

[0018] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно $1,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,5 \times 10^6$ АПК/см^2, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно $3,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $6,0 \times 10^6$ АПК/см^2.

[0019] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно $2,0 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,0 \times 10^6$ АПК/см^2, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно $4,0 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $5,5 \times 10^6$ АПК/см^2.

[0020] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно 1×10^8 АПК до приблизительно $3,5 \times 10^8$ АПК, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно $3,5 \times 10^8$ АПК до приблизительно 1×10^9 АПК.

[0021] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно $1,5 \times 10^8$ АПК до приблизительно 3×10^8 АПК, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно 4×10^8 АПК до приблизительно $7,5 \times 10^8$ АПК.

[0022] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении выбрано из диапазона от приблизительно 2×10^8 АПК до приблизительно $2,5 \times 10^8$ АПК, и при этом число АПК при быстром втором размножении выбрано из диапазона от приблизительно $4,5 \times 10^8$ АПК до приблизительно $5,5 \times 10^8$ АПК.

[0023] Согласно некоторым вариантам реализации приблизительно 2,5 × 10^8 АПК добавляют при подготовительном первом размножении и 5 × 10^8 АПК добавляют при быстром втором размножении.

[0024] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 100:1.

[0025] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 50:1.

[0026] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 25:1.

[0027] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 20:1.

[0028] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 10:1.

[0029] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL в указанной второй популяции TIL по меньшей мере в 50 раз больше, чем в первой популяции TIL.

[0030] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает осуществление после этапа сбора терапевтической популяции TIL дополнительного этапа, состоящего из:

переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии.

[0031] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов опухоли распределяют по множеству отдельных контейнеров, в каждом из которых вторую популяцию TIL получают из первой популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения, а третью популяцию TIL получают из второй популяции TIL на этапе быстрого второго размножения, и при этом терапевтическую популяцию TIL, взятую из третьей популяции TIL, собирают из каждого контейнера указанной множества контейнеров и объединяют с получением собранной популяции TIL.

[0032] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество отдельных контейнеров содержит по меньшей мере два отдельных контейнера.

[0033] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до двадцати отдельных контейнеров.

[0034] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до десяти отдельных контейнеров.

[0035] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до пяти отдельных контейнеров.

[0036] Согласно некоторым вариантам реализации каждый из указанных отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

[0037] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов опухоли распределяют в одном контейнере.

[0038] Согласно некоторым вариантам реализации указанный один контейнер

содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

[0039] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК); и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

[0040] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоев клеток.

[0041] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

[0042] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при толщине, составляющей от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

[0043] Согласно некоторым вариантам реализации при быстром втором размножении АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при толщине, составляющей от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

[0044] Согласно некоторым вариантам реализации при быстром втором размножении АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

[0045] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения указанное подготовительное первое размножение осуществляют в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, а на этапе быстрого второго размножения указанное быстрое второе размножение осуществляют во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область.

[0046] Согласно некоторым вариантам реализации указанный второй контейнер больше указанного первого контейнера.

[0047] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК); и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

[0048] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую

поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоев клеток.

[0049] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

[0050] Согласно некоторым вариантам реализации при указанном быстром втором размножении АПК наслаивают на указанную вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

[0051] Согласно некоторым вариантам реализации при указанном быстром втором размножении АПК наслаивают на указанную вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

[0052] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

[0053] Согласно некоторым вариантам реализации в каждом из тех же самых контейнеров, где осуществляют подготовительное первое размножение первой популяции TIL, осуществляют и быстрое второе размножение второй популяции TIL, продуцированной из такой первой популяции TIL.

[0054] Согласно некоторым вариантам реализации каждый контейнер содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

[0055] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

[0056] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоев клеток.

[0057] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

[0058] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

[0059] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

[0060] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

[0061] Согласно некоторым вариантам реализации, отличающихся тем, что для каждого контейнера, в котором осуществляют подготовительное первое размножение первой популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения, первый контейнер содержит первую поверхностную область, клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область; при этом отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,1 до приблизительно 1:10.

[0062] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,2 до приблизительно 1:8.

[0063] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,3 до приблизительно 1:7.

[0064] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,4 до приблизительно 1:6.

[0065] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,5 до приблизительно 1:5.

[0066] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,6 до приблизительно 1:4.

[0067] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго

размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,7 до приблизительно 1:3.5.

[0068] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,8 до приблизительно 1:3.

[0069] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, выбрано из диапазона от приблизительно 1:1,9 до приблизительно 1:2,5.

[0070] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, составляет приблизительно 1:2.

[0071] Согласно некоторым вариантам реализации после 2-3 дней на этапе быстрого второго размножения в клеточную культуральную среду добавляют дополнительный ИЛ-2.

[0072] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает криоконсервирование собранной популяции TIL на этапе сбора терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации.

[0073] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает этап криоконсервирования пакета для инфузии.

[0074] Согласно некоторым вариантам реализации указанный процесс криоконсервации осуществляют с использованием отношения 1:1 собранной популяции TIL к среде для криоконсервации.

[0075] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[0076] Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК представляют собой облученные аллогенные МКПК.

[0077] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), и при этом общее количество МКПК, добавленное в клеточную культуральную среду на этапе подготовительного первого размножения, составляет приблизительно $2,5 \times 10^8$.

[0078] Согласно некоторым вариантам реализации на этапе быстрого второго размножения антигенпрезентирующие клетки (АПК) в клеточной культуральной среде представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), и при этом общее количество МКПК, добавленное в клеточную культуральную среду на этапе быстрого второго размножения, составляет приблизительно 5×10^8.

[0079] Согласно некоторым вариантам реализации указанные

антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[0080] Согласно некоторым вариантам реализации сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL осуществляют с применением мембранной системы обработки клеток.

[0081] Согласно некоторым вариантам реализации сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL осуществляют с применением системы обработки клеток LOVO.

[0082] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 60 фрагментов на контейнер на этапе подготовительного первого размножения, причем каждый фрагмент имеет объем, составляющий приблизительно 27 $мм^3$.

[0083] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом, составляющим от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

[0084] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общим объемом, составляющим приблизительно 1350 $мм^3$.

[0085] Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общей массой, составляющей от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

[0086] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культур клеток Xuri.

[0087] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация ИЛ-2 составляет от приблизительно 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

[0088] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация ИЛ-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

[0089] Согласно некоторым вариантам реализации указанный пакет для инфузии на этапе переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии представляет собой содержащий HypoThermosol пакет для инфузии.

[0090] Согласно некоторым вариантам реализации среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[0091] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

[0092] Согласно некоторым вариантам реализации каждый период из первого периода на этапе подготовительного первого размножения и второго периода на этапе быстрого второго размножения осуществляют индивидуально в пределах периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[0093] Согласно некоторым вариантам реализации первый период на этапе

подготовительного первого размножения осуществляют в пределах периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[0094] Согласно некоторым вариантам реализации второй период на этапе быстрого второго размножения осуществляют в пределах периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

[0095] Согласно некоторым вариантам реализации каждый период из первого периода на этапе подготовительного первого размножения и второго периода на этапе быстрого второго размножения осуществляют индивидуально в пределах периода 7 дней.

[0096] Согласно некоторым вариантам реализации указанные этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в пределах периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

[0097] Согласно некоторым вариантам реализации указанные этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в пределах периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

[0098] Согласно некоторым вариантам реализации указанные этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в пределах периода, составляющего приблизительно 14 дней.

[0099] Согласно некоторым вариантам реализации указанные этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в пределах периода, составляющего приблизительно 15 дней.

[00100] Согласно некоторым вариантам реализации указанные этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в пределах периода, составляющего приблизительно 16 дней.

[00101] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает этап криоконсервирования собранной терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации, при этом этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL и криоконсервации осуществляют за 16 дней или менее.

[00102] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе сбора терапевтической популяции TIL, содержит достаточно TIL для терапевтически эффективной дозировки указанных TIL.

[00103] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$.

[00104] Согласно некоторым вариантам реализации третья популяция TIL на этапе быстрого второго размножения обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона гамма и/или повышенную поликлональность.

[00105] Согласно некоторым вариантам реализации указанная третья популяция TIL на этапе быстрого второго размножения обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL,

полученными с использованием процесса длительностью более 18 дней.

[00106] Согласно некоторым вариантам реализации эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, взятые из третьей популяции TIL на этапе быстрого второго размножения, демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, взятых из второй популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения.

[00107] Согласно некоторым вариантам реализации указанную терапевтическую популяцию TIL с этапа сбора терапевтической популяции TIL вводят пациенту путем инфузии.

[00108] Настоящее изобретение также обеспечивает способ лечения субъекта с раком, отличающийся тем, что указанный способ включает введение размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающий:

(a) взятие и/или получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, взятого у указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(b) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, причем подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение приблизительно 1-7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL по меньшей мере в 50 раз больше, чем в первой популяции TIL;

(c) осуществление быстрого второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раза больше числа АПК, добавленного на этапе (b), причем быстрое второе размножение осуществляют в течение приблизительно 1-11 дней с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяции TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, при этом быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область;

(d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c);

(e) перенос собранной популяции TIL с этапа (d) в пакет для инфузии; и

(f) введение терапевтически эффективной дозировки TIL с этапа (e) указанному субъекту.

[00109] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL, достаточное для введения терапевтически эффективной дозировки на этапе (f), составляет от приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$.

[00110] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

[00111] Согласно некоторым вариантам реализации перед введением терапевтически эффективной дозировки клеток TIL на этапе (f) у указанного пациента используют схему немиелоаблативной лимфодеплеции.

[00112] Согласно некоторым вариантам реализации указанная схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней и последующего введения флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[00113] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ дополнительно включает этап лечения указанного пациента по схеме с высокими дозами ИЛ-2, начиная со следующего дня после введения клеток TIL указанному пациенту на этапе (f).

[00114] Согласно некоторым вариантам реализации указанная схема с высокими дозами ИЛ-2 включает введение 600 000 или 720 000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

[00115] Согласно некоторым вариантам реализации указанная третья популяция TIL на этапе (b) обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[00116] Согласно некоторым вариантам реализации указанная третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[00117] Согласно некоторым вариантам реализации указанные эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, взятые из третьей популяции TIL на этапе (c), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, взятых из второй популяции клеток на этапе (b).

[00118] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль.

[00119] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе мультиформной глиобластомы (GBM)), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

[00120] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

[00121] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой меланому.

[00122] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой ПКРГШ.

[00123] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак шейки матки.

[00124] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой НМРЛ.

[00125] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

[00126] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[00127] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

[00128] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[00129] Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой закрытый контейнер.

[00130] Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой G-контейнер.

[00131] Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой GREX-10.

[00132] Согласно некоторым вариантам реализации указанный закрытый контейнер содержит GREX-100.

[00133] Согласно некоторым вариантам реализации указанный закрытый контейнер содержит GREX-500.

[00134] Согласно настоящему изобретению также предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученных с применением способа согласно описанию в настоящем документе.

[00135] Согласно настоящему изобретению также предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[00136] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе обеспечивает повышенное продуцирование интерферона-гамма.

[00137] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе обеспечивает повышенную поликлональность.

[00138] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе обеспечивает повышенную эффективность.

[00139] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[00140] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[00141] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[00142] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК).

[00143] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК.

[00144] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК.

[00145] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3.

[00146] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с

использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3.

[00147] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3.

[00148] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающийся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления OKT3.

[00149] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления OKT3.

[00150] Согласно некоторым вариантам реализации терапевтическая популяция TIL согласно описанию в настоящем документе способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления OKT3.

[00151] Согласно настоящему изобретению также предложена композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL согласно описанию в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель.

[00152] Согласно настоящему изобретению также предложен стерильный пакет для инфузии, содержащий композицию TIL согласно описанию в настоящем документе.

[00153] Согласно настоящему изобретению также предложен крио консервированный состав с терапевтической популяцией TIL согласно описанию в настоящем документе.

[00154] Согласно настоящему изобретению также предложена композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL согласно описанию в настоящем документе и среду для криоконсервации.

[00155] Согласно некоторым вариантам реализации среда для криоконсервации содержит ДМСО.

[00156] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда для криоконсервации содержит 7-10% ДМСО.

[00157] Согласно настоящему изобретению также предложены а криоконсервированный препарат с композицией TIL согласно описанию в настоящем документе.

[00158] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в качестве медикамента.

[00159] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака.

[00160] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака с солидной опухолью.

[00161] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе для применения в лечении рака, выбранного из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

[00162] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, выбранного из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

[00163] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом рак представляет собой меланому.

[00164] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом рак представляет собой ПКРГШ.

[00165] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом рак представляет собой рак шейки матки.

[00166] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой НМРЛ.

[00167] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

[00168] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно

описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[00169] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

[00170] Согласно некоторым вариантам реализации композиция TIL согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в лечении рака, при этом указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[00171] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложено применение композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе в способе лечения рака у субъекта, включающий введение терапевтически эффективной дозировки композиции TIL указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой меланому. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой ПКРГШ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой НМРЛ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой гипермутированный рак. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[00172] Согласно некоторым вариантам реализации композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе предназначена для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение терапевтически эффективной дозировки композиции TIL указанному субъекту. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной

карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе мультиформной глиобластомы (GBM)), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

[00173] Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) согласно описанию в настоящем документе.

[00174] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой солидную опухоль.

[00175] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе мультиформной глиобластомы (GBM)), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

[00176] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой меланому. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой ПКРГШ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой НМРЛ. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой гипермутированный рак. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[00177] Согласно настоящему изобретению также предложен способ размножения Т-клеток, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток, взятой от донора, путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для подготовки активации первой популяции Т-клеток;

(b) после того как активация первой популяции Т-клеток, подготовленной на этапе (a), начинает ослабевать, осуществление быстрого второго размножения первой популяции Т-клеток путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для стимуляции активации первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и

(c) сбор второй популяции Т-клеток.

[00178] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью до 7 дней.

[00179] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 11 дней.

[00180] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

[00181] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней, а быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью 9 дней.

[00182] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

[00183] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

[00184] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней; и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней.

[00185] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде, содержащей ОКТ-3 и ИЛ-2.

[00186] Согласно некоторым вариантам реализации указанная первая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[00187] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде, содержащей ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[00188] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда необязательно содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и необязательно первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), причем указанная первая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанная первая популяция АПК нанесена слоем на первую газопроницаемую поверхность, а на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и вторую популяцию АПК, причем указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанная вторая популяция АПК нанесена

слоем на первую газопроницаемую поверхность, и при этом указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

[00189] Согласно некоторым вариантам реализации отношение числа АПК во второй популяции АПК к количеству АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно 2:1.

[00190] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно $2,5\times10^8$ и число АПК во второй популяции АПК составляет приблизительно 5×10^8.

[00191] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (a) первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине, составляющей 2 слоя АПК.

[00192] Согласно некоторым вариантам реализации указанного способа на этапе (b) вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине, выбранной из диапазона 4-8 слоев АПК.

[00193] Согласно некоторым вариантам реализации отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (a), составляет 2:1.

[00194] Согласно некоторым вариантам реализации указанные АПК представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[00195] Согласно некоторым вариантам реализации указанные АПК содержат МКПК, отличающиеся тем, что указанные МКПК облучены и являются экзогенными для донора первой популяции Т-клеток.

[00196] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

[00197] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (MIL).

[00198] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (ЛПК).

[00199] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда представляет собой среду с определенным составом и/или бессывороточную среду.

[00200] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

[00201] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки.

[00202] В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™

OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, среду CTS™ AIM-V, CTS™ AIM-V SFM, не содержащую инородных компонентов среду для размножения Т-клеток LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и модифицированную Исковым среду Дульбекко.

[00203] Согласно некоторым вариантам реализации указанные сывороточная добавка или заменитель сыворотки выбраны из группы, состоящей из сывороточной добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer (CTS™ OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement) и заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (CTS™ Immune Cell Serum Replacement).

[00204] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит один или более альбуминов или заменителей альбумина.

[00205] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит одну или более аминокислот.

[00206] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов.

[00207] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов.

[00208] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов. Согласно

[00209] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит альбумин.

[00210] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}.

[00211] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00212] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки в клеточной культуральной среды составляет (% об.) от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от клеточной культуральной среды.

[00213] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация

заменителя сыворотки в клеточной культуральной среде составляет приблизительно 3%, приблизительно 5% или приблизительно 10% от общего объема клеточной культуральной среды.

[00214] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит глутамин (т.е., GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ.

[00215] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит глутамин (т.е., GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00216] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ.

[00217] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[00218] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит среду с определенным составом, описанную в международной PCT-публикации WO/1998/030679.

[00219] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит количество глицина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-гистидина в диапазоне приблизительно 5-250 мг/л, L-изолейцина в диапазоне приблизительно 5-300 мг/л, L-метионина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-фенилаланина в диапазоне приблизительно 5-400 мг/л, L-пролина в диапазоне приблизительно 1-1000 мг/л, L-гидроксипролина в диапазоне приблизительно 1-45 мг/л, L-серина в диапазоне приблизительно 1-250 мг/л, L-треонина в диапазоне приблизительно 10-500 мг/л, L-триптофана в диапазоне приблизительно 2-110 мг/л, L-тирозина в диапазоне приблизительно 3-175 мг/л, L-валина в диапазоне приблизительно 5-500 мг/л, тиамина в диапазоне приблизительно 1-20 мг/л, восстановленного глутатиона в диапазоне приблизительно 1-20 мг/л, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата в диапазоне приблизительно 1-200 мг/л, насыщенного железом трансферрина в диапазоне от приблизительно 1-50 мг/л, инсулина в диапазоне приблизительно 1-100 мг/л, селенита натрия в диапазоне приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л и/или альбумина (например, AlbuMAX® I) в диапазоне приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[00220] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда

содержит один или более ингредиентов, не содержащих следовых элементов, которые присутствуют в среде с определенным составом в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «Диапазон концентраций в среде IX» в таблице A настоящего документа.

[00221] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность клеточной культуральной среды составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль.

[00222] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия.

[00223] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ) и/или 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[00224] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известен как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

[00225] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer, 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS, 55 мМ BME и необязательно глутамин.

[00226] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ и 2 мМ Glutamax, необязательно дополнительно содержащую 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00227] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, 2 мМ Glutamax, и необязательно дополнительно содержит 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00228] Согласно настоящему изобретению также предложена композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающая:

i) терапевтическую популяцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), и

ii) среду с определенным составом или бессывороточную среду, необязательно содержащие (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

[00229] Согласно настоящему изобретению также предложена размноженная композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающая:

i) терапевтическую популяцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), и

ii) среду с определенным составом или бессывороточную среду, необязательно

содержащие (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

[00230] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

[00231] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки.

[00232] В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и модифицированную Исковым среду Дульбекко.

[00233] Согласно некоторым вариантам реализации указанные сывороточная добавка или заменитель сыворотки выбраны из группы, состоящей из сывороточной добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer и заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[00234] Согласно некоторым вариантам реализации среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более альбуминов или заменителей альбумина.

[00235] Согласно некоторым вариантам реализации среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит одну или более аминокислот.

[00236] Согласно некоторым вариантам реализации среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов.

[00237] Согласно некоторым вариантам реализации среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов.

[00238] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков и один или более следовых элементов.

[00239] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит альбумин.

[00240] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит альбумин и один или более

ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}.

[00241] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00242] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки в указанной среде с определенным составом или бессывороточной среде составляет (% об.) от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от клеточной культуральной среды.

[00243] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки в среде с определенным составом или бессывороточной среде составляет приблизительно 3%, приблизительно 5% или приблизительно 10% от общего объема клеточной культуральной среды.

[00244] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит глутамин (т.е., GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ.

[00245] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит глутамин (т.е., GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00246] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ.

[00247] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[00248] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с

определенным составом или бессывороточная среда содержит среду с определенным составом, описанную в международной PCT-публикации WO/1998/030679.

[00249] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит количество глицина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-гистидина в диапазоне приблизительно 5-250 мг/л, L-изолейцина в диапазоне приблизительно 5-300 мг/л, L-метионина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-фенилаланина в диапазоне приблизительно 5-400 мг/л, L-пролина в диапазоне приблизительно 1-1000 мг/л, L-гидроксипролина в диапазоне приблизительно 1-45 мг/л, L-серина в диапазоне приблизительно 1-250 мг/л, L-треонина в диапазоне приблизительно 10-500 мг/л, L-триптофана в диапазоне приблизительно 2-110 мг/л, L-тирозина в диапазоне приблизительно 3-175 мг/л, L-валина в диапазоне приблизительно 5-500 мг/л, тиамина в диапазоне приблизительно 1-20 мг/л, восстановленного глутатиона в диапазоне приблизительно 1-20 мг/л, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата в диапазоне приблизительно 1-200 мг/л, насыщенного железом трансферрина в диапазоне от приблизительно 1-50 мг/л, инсулина в диапазоне приблизительно 1-100 мг/л, селенита натрия в диапазоне приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л и/или альбумина (например, AlbuMAX® I) в диапазоне от приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[00250] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более ингредиентов, не содержащих следовых элементов, которые присутствуют в среде с определенным составом в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «Диапазон концентраций в среде IX» в таблице A настоящего документа.

[00251] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом или бессывороточной среды составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль.

[00252] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия.

[00253] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ) и/или 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[00254] Согласно некоторым вариантам реализации среда с определенным составом или бессывороточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известен как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

[00255] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer, 3%

заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS, 55 мМ BME и необязательно глутамин.

[00256] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ и 2 мМ Glutamax, необязательно дополнительно содержащую 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00257] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, 2 мМ Glutamax, и необязательно дополнительно содержит 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00258] Согласно некоторым вариантам реализации указанная популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL.

[00259] Согласно некоторым вариантам реализации указанная терапевтическая популяция TIL демонстрирует подъем уровня ИФН-γ в сыворотке, причем указанный подъем уровня ИФН-γ превышает 200 пг/мл, превышает 250 пг/мл, превышает 300 пг/мл, превышает 350 пг/мл, превышает 400 пг/мл, превышает 450 пг/мл, превышает 500 пг/мл, превышает 550 пг/мл, превышает 600 пг/мл, превышает 650 пг/мл, превышает 700 пг/мл, превышает 750 пг/мл, превышает 800 пг/мл, превышает 850 пг/мл, превышает 900 пг/мл, превышает 950 пг/мл или превышает 1000 пг/мл.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[00260] **Фиг. 1A-1C: A)** Сравнение процесса 2A (продолжительность процесса - приблизительно 22 дня) и варианта реализации процесса Gen 3 для получения TIL (процесс продолжительностью приблизительно от 14 дней до 16 дней). **B)** Схема примера процесса Gen3 с общим описанием этапов A - F (процесс продолжительностью приблизительно от 14 дней до 16 дней). **C)** Схема трех примеров процессов Gen 3 с общим описанием этапов A - F (процесс продолжительностью приблизительно от 14 дней до 16 дней) для каждого из трех вариантов процесса.

[00261] **Фиг. 2:** Блок-схема эксперимента для сравнения GEN 2 (процесс 2A) и GEN 3.

[00262] **Фиг. 3A-3C: A)** L4054 - Фенотипические характеристики продукта TIL при процессах Gen 2 и Gen 3. **B)** L4055 - Фенотипические характеристики продукта TIL при процессах Gen 2 и Gen 3. **C)** M1085T - Фенотипические характеристики продукта TIL при процессах Gen 2 и Gen 3.

[00263] **Фиг. 4A-4C**: **A)** L4054 - Анализ на маркеры клеток памяти продукта TIL из процессов Gen 2 и Gen 3. **B)** L4055 - Анализ на маркеры клеток памяти продукта TIL из процессов Gen 2 и Gen 3. **C)** M1085T- Анализ на маркеры клеток памяти продукта TIL из процессов Gen 2 и Gen 3.

[00264] **Рисунок 5:** Маркеры активации и истощения L4054 **(A)** заблокированы по CD4+, **(B)** заблокированы по CD8+.

[00265] **Рисунок 6:** Маркеры активации и истощения L4055 **(A)** заблокированы по CD4+, **(B)** заблокированы по CD8+.

[00266] **Фиг. 7:** Продуцирование ИФНγ (пг/мл): (A) L4054, (B) L4055, и (C) M1085T для процессов Gen 2 и Gen 3: Каждый столбец здесь соответствует среднему+SEM для уровней ИФНγ в стимулированных, нестимулированных клетках и в контроле со средой. Оптическая плотность, измеренная при 450 нм.

[00267] **Фиг. 8:** ИФА ELISA концентрации ИЛ-2 в супернатанте культуры клеток: **(A) L4054** и **(B) L4055**. Каждый столбец здесь соответствует среднему+SEM для уровней ИЛ-2 в отработанной среде. Оптическая плотность, измеренная при 450 нм.

[00268] **Фиг. 9:** Количественное определение глюкозы и лактата (г/л) в отработанной среде: (A) Глюкоза и (B) Лактат: В двух опухолевых линиях при обоих процессах наблюдалось снижение уровней глюкозы на протяжении всего размножения REP. И напротив, для лактата, как и ожидалось, наблюдалось повышение уровней. И снижение уровня глюкозы, и повышение уровней лактата были сопоставимы в процессах Gen 2 и Gen 3.

[00269] **Фиг. 10: A)** Количественное определение L-глутамина в отработанной среде для L4054 и L4055. **B)** Количественное определение Glutamax в отработанной среде для L4054 и L4055. C) Количественное определение аммиака в отработанной среде для L4054 и L4055.

[00270] **Фиг. 11:** Анализ длины теломер. Относительная длина теломер (RTL) отражает среднюю флуоресценцию теломер на хромосому/геном при процессах Gen 2 и Gen 3 относительно флуоресценции теломер на хромосому/геном в линии контрольных клеток (линия клеток лейкоза 1301), определенную с использованием набора DAKO.

[00271] **Фиг. 12:** Анализ уникальных последовательностей CDR3 итогового продукта TIL для L4054 и L4055 в процессах Gen 2 и Gen 3. В столбцах приведено количество уникальных клонотипов TCR B, идентифицированных в 1×10^6 клеток, собранных в день сбора в рамках процесса Gen 2 (*например,* 22) и Gen 3 (*например,* день 14-16). Gen 3 демонстрирует большее клональное разнообразие по сравнению с Gen 2, судя по количеству уникальных пептидных CDR в образце.

[00272] **Фиг. 13:** Частота уникальных последовательностей CDR3 для собранного итогового клеточного продукта L4054 TIL (Процесс Gen 2 (*например,* на 22 день) и Gen 3 (*например,* на 14-16 день)).

[00273] **Фиг. 14:** Частота уникальных последовательностей CDR3 для собранного итогового клеточного продукта L4055 TIL (Процесс Gen 2 (*например,* на 22 день) и Gen 3 (*например,* на 14-16 день)).

[00274] **Фиг. 15:** Индекс разнообразия для итогового продукта TIL L4054 и L4055 в рамках процессов Gen 2 и Gen 3. Индекс разнообразия (энтропии) Шеннона представляет собой более надежную и распространенную метрику для сравнения. В Gen 3 L4054 и L4055 демонстрировали несколько большее разнообразие, чем в Gen 2.

[00275] **Фиг. 16:** Необработанные данные для количества клеток на 7 день - Gen 3,

Инициация REP, приведены в таблице 22 (см. пример 5 ниже).

[00276] **Фиг. 17:** Необработанные данные для количества клеток на 11 день - Gen 2, Инициация REP, и Gen 3, Масштабирование приведены в таблице 22 (см. пример 5 ниже).

[00277] **Фиг. 18:** Необработанные данные для количества клеток на 16 день - Gen 2, Масштабирование, и Gen 3, Сбор (*например,* день 16) приведены в таблице 23 (см. пример 5 ниже).

[00278] **Фиг. 19:** Необработанные данные для количества клеток на 22 день - Gen 2, Сбор (*например,* день 22) приведены в таблице 23 (см. пример 5 ниже). Для L4054 в Gen 2 результаты подсчета клеток после LOVO экстраполировали на 4 флакона, поскольку это соответствовало общему количеству в исследовании. 1 флакон был загрязнен, и экстраполяцию проводили в общей сложности для 6,67E+10.

[00279] **Фиг. 20:** Необработанные данные для результатов проточной цитометрии, представленной на фиг. 3A, 4A и 4B.

[00280] **Фиг. 21:** Необработанные данные для результатов проточной цитометрии, представленной на фиг. 3C и 4C.

[00281] **Фиг. 22:** Необработанные данные для результатов проточной цитометрии, представленной на фиг. 5 и 6.

[00282] **Фиг. 23:** Необработанные данные для результатов анализа продуцирования ИФНγ для образцов L4054, представленного на фиг. 7.

[00283] **Фиг. 24:** Необработанные данные для результатов анализа продуцирования ИФНγ для образцов L4055, представленного на фиг. 7.

[00284] **Фиг. 25:** Необработанные данные для результатов анализа продуцирования ИФНγ для образцов M1085T, представленного на фиг. 7.

[00285] **Фиг. 26:** Необработанные данные для результатов анализа ИФА ELISA на ИЛ-2, представленных на фиг. 8.

[00286] **Фиг. 27:** Необработанные данные для метаболического субстрата и результатов метаболического анализа, представленного на фиг. 9 и 10.

[00287] **Фиг. 28:** Необработанные данные для результатов анализа относительной длины теломер, представленного на фиг. 11.

[00288] **Фиг. 29:** Необработанные данные для результатов анализа уникальных последовательностей CD3 и клонального разнообразия, представленного на фиг. 12 и 15.

[00289] **Фиг. 30:** Показано сравнение между различными вариантами реализации процессов: Gen 2 (процесс 2A) и Gen 3.1.

[00290] **Фиг. 31:** Таблица с описанием различных признаков вариантов реализации процессов Gen 2, Gen 2.1 и Gen 3.0.

[00291] **Фиг. 32:** Общее описание условий среды для варианта реализации процесса Gen 3, называемого Gen 3.1.

[00292] **Фиг. 33:** Таблица с описанием различных признаков вариантов реализации процессов Gen 2, Gen 2.1 и Gen 3.0.

[00293] **Фиг. 34:** Таблица сравнения различных признаков вариантов реализации

процессов Gen 2 и Gen 3.0.

[00294] **Фиг. 35:** Таблица, описывающая использование сред в различных вариантах реализации описанных процессов размножения.

[00295] **Фиг. 36:** Сравнение фенотипов: для вариантов реализации процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 продемонстрирована сопоставимая экспрессия CD28, CD27 и CD57. В тесте Gen 3.1 (включает добавление OKT-3 и фидерных клеток на 0 день) при сборе была достигнута максимальная возможная емкость флакона.

[00296] **Фиг. 37:** Большее продуцирование ИФНγ в итоговом продукте Gen 3. Оценку анализа ИФНγ (ИФА ELISA) проводили в замороженном супернатанте культуры для сравнения обоих процессов. Для каждой опухоли проводили стимуляцию в течение ночи на покрытом антителом к CD3 планшете, с использованием свежего продукта TIL для каждого из процессов Gen 2 (*например,* на 22 день) и Gen 3 (*например,* на 16 день). Каждый столбец отражает уровни ИФНγ в стимулированной, нестимулированной и в контрольной среде.

[00297] **Фиг. 38:** A) Анализ уникальных последовательностей CDR3 для итогового продукта TIL: в столбцах приведено количество уникальных клонотипов TCR B, идентифицированных в 1×10^6 клетках, собранных в ходе процесса Gen 2 (*например,* день 22) и Gen 3 (*например,* день 14-16). Gen 3 демонстрирует большее клональное разнообразие по сравнению с Gen 2 на основании количества уникальных пептидных CDR в образце. B) Индекс разнообразия итогового продукта TIL: индекс разнообразия (энтропии) Шеннона представляет собой более надежную и распространенную метрику для сравнения Gen 3 показал несколько большее разнообразие по сравнению с Gen 2. C) Анализ уникальных последовательностей CDR3 итогового продукта TIL для L4063 и L4064 в рамках процессов Gen 3, контрольного Gen 3.1 (Gen 3.1 Контроль) и тестового Gen 3.1. (Gen 3.1 Тест) В столбцах приведено количество уникальных клонотипов TCR B, идентифицированных в 1×10^6 клетках, собранных в День сбора 16, для процессов Gen 3 и Gen 3.1. Для Gen 3.1 наблюдалось незначительно большее клональное разнообразие по сравнению с Gen 3, на основании количества уникальных пептидных CDR в образце. D) Индекс разнообразия для итогового продукта TIL на L4063 и L4064 в рамках Gen 3. Контрольный процесс Gen 3.1 и тестовый процесс Gen 3.1. Индекс разнообразия (энтропии) Шеннона представляет собой более надежную и распространенную метрику для сравнения. В условиях Gen 3.1 для L4063 и L4064 наблюдалось незначительно большее разнообразие по сравнению с процессом Gen 3.

[00298] **Фиг. 39:** 199 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 97,07% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 2, общих с итоговым продуктом Gen 3.

[00299] **Фиг. 40:** 1833 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 2, общих с итоговым продуктом Gen 3.

[00300] **Фиг. 41:** Схематическое представление примера варианта реализации

процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00301] **Фиг. 42:** Схематическое представление примера варианта реализации для размножения TIL из гемопоэтических злокачественных новообразований с использованием процесса Gen 3. На 0 день Т-клеточную фракцию (CD3+, CD45+) выделяют из продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, цельной крови или продукта расщепления опухоли (свежего или размороженного) с применением способа положительного или отрицательного отбора, *т.е.*, извлечения Т-клеток с использованием маркера Т-клеток (CD2, CD3 и т.п., или извлечения других клеток с сохранением Т-клеток), или градиентного центрифугирования.

[00302] **Фиг. 43:** Схематическое представление примера варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00303] **Фиг. 44:** Общее описание примера варианта реализации процесса (Gen 3.1 Тест) Gen 3.1 (16-дневный процесс).

[00304] **Фиг. 45:** Данные по пролиферации TIL, среднее общее количество жизнеспособных клеток на фрагмент опухоли, процент жизнеспособности в день сбора и общее количество жизнеспособных клеток (TVC) в день сбора для примеров вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест). В тестовом процессе Gen 3.1 (который включает добавление OKT-3 и фидерных клеток на день 0) при сборе была достигнута максимальная возможная емкость флакона. При инициации на 0 день процесса в максимальном числе флаконов - 4, при каждом сборе TVC результат должен быть умножен на 4.

[00305] **Фиг. 46:** Гистограмма, отражающая общее количество жизнеспособных клеток (TVC) и процент жизнеспособности для примеров вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест), 16-дневный процесс.

[00306] **Фиг. 47:** Данные, показывающие, что примеры вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) давали клетки, которые демонстрировали сопоставимую экспрессию CD28, CD27 и CD57.

[00307] **Фиг. 48:** Данные, показывающие, что показатели статуса памяти TIL были сопоставимыми во всех клетках, полученных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест). Показатели статуса памяти REP TIL представлены следующим образом: подгруппы клеток памяти CD4+ или CD8+ TIL разделяли на разные подгруппы памяти. Необученные (CD45RA+CD62L+), CM: клетки центральной памяти (CD45RA-CD62L+), EM: Эффекторные клетки памяти (CD45RA-CD62L-), TEMRA/TEFF: RA+ Эффекторные клетки памяти /Эффекторы (CD45RA+CD62L+). Приведенная гистограмма отражает процент положительных CD45+/- CD62L+/- клеток при гейтировании по CD4+ или CD8+.

[00308] **Фиг. 49:** Данные, показывающие, что маркеры активации/истощения TIL были сопоставимыми во всех клетках, полученных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) при гейтировании по CD4+. Активацию и истощение REP TIL определяли с помощью многоцветной проточной

цитометрии. Собранные образцы TIL окрашивали антителами для проточной цитометрии (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). Гистограмма отражает процент CD4+ или CD8+ TIL в REP TIL.

[00309] **Фиг. 50:** Данные, показывающие, что маркеры активации/истощения TIL были сопоставимыми во всех клетках, полученных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль и Gen 3.1) при гейтировании по CD8+. Активацию и истощение REP TIL определяли с помощью многоцветной проточной цитометрии. Собранные образцы TIL окрашивали антителами для проточной цитометрии (CD3-BUV395, PD-1-BV421, 2B4/CD244-PB, CD8-BB515, CD25-BUV563, BTLA-PE, KLRG1-PE-Dazzle 594, TIM-3-BV650, CD194/CCR4-APC, CD4-VioGreen, TIGIT-PerCP-eFluor 710, CD183-BV711, CD69-APC-R700, CD95-BUV737, CD127-PE-Cy7, CD103-BV786, LAG-3-APC-eFluor 780). Гистограмма отражает процент CD4+ или CD8+ TIL в REP TIL.

[00310] **Фиг. 51:** Данные, отражающие большее продуцирование ИФН-γ, наблюдаемое для итогового продукта Gen 3.1. Оценку ИФА ELISA на ИФНγ проводили в замороженном супернатанте культуры для сравнения обоих процессов. Для каждой опухоли в течение ночи проводили стимуляцию в планшете, покрытом антителом к CD3, используя свежий продукт TIL в день каждого сбора. Каждый столбец отражает уровни ИФН-γ в стимулированной, нестимулированной и в контрольной среде.

[00311] **Фиг. 52:** Данные, показывающие, что концентрация ИЛ-2 в супернатанте была сопоставимой для всех примеров вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) при использовании стандартной среды. Левая панель: L4063-Gen 2, стандартная среда. Правая панель: L4064- среда CTS Optimizer. *ИФА ELISA в разбавителем AIM V

[00312] **Фиг. 53:** Данные, показывающие, что концентрации метаболитов были сопоставимыми в супернатантах для всех примеров вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест). L4063 TIL размножали в стандартной среде. L4064 TIL размножали в среде CTS Optimizer.

[00313] **Фиг. 54:** анализ длины теломер для примеров вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест). анализ длины теломер для происходящих из опухолей с идентификационными номерами L4063 и L4064 клеток : величина относительной длины теломер (RTL) соответствует отношению средней флуоресценции теломер на хромосому/геном в клетках, полученных в процессах Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест к флуоресценции теломер на хромосому/геном в контрольной линии клеток (линия клеток лейкоза 1301) с применением набора DAKO.

[00314] **Фиг. 55:** Схематическое представление примера варианта реализации тестового процесса Gen 3.1 (оптимизированный Gen 3.1) (16-17-дневный процесс).

[00315] **Фиг. 56:** Схематическое представление примера варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00316] **Фиг. 57A-57B:** Таблицы сравнения примеров процессов Gen 2 и Gen 3 с выделенными примерами различий.

[00317] **Фиг. 58:** Схематическое представление примера варианта реализации временной шкалы процесса получения Gen 3 (16/17-дневный процесс).

[00318] **Фиг. 59:** Схематическое представление примера варианта реализации процесса Gen 3 (а 14-16-дневный процесс).

[00319] **Фиг. 60:** Обобщенные данные для дня 16/17 для трех опытных запусков в примере варианта реализации процесса Gen 3.

[00320] **Фиг. 61:** Данные расширенного фенотипа TIL: показаны характеристики дифференцировки с идентификационными данными TIL (ID) для клеток, полученных при двух опытных запусках примера варианта реализации процесса Gen 3.

[00321] **Фиг. 62:** Данные расширенного фенотипа TIL, размноженных из опухолей легкого: показаны характеристики дифференцировки с идентификационными данными (ID) TIL для клеток, полученных при двух пилотных (PD) запусках в примере варианта реализации процесса Gen 3 с применением опухолевых тканей легких.

[00322] **Фиг. 63:** Данные расширенного фенотипа (чистота, идентификационные данные и статус памяти) TIL, размноженных из опухолей яичников: приведены фенотипические характеристики: чистота, идентификационные данные и статус памяти клеток, размноженных из опухолей яичников в примерах вариантов реализации процессов Gen 2, Gen 3.1 и FR ER (замороженная опухоль, ранний REP); * отмечено не тестируемое условие; ^{Y} проблема с взятием образца, малое количество TVC или нежизнеспособность клеток после размораживания.

[00323] **Фиг. 64:** Показана стратегия гейтирования для описания характеристик TIL (показана иерархия гейтирования) и данные расширенных фенотипических характеристик клеток, полученных при двух опытных запусках примера варианта реализации процесса Gen 3.

[00324] **Фиг. 65:** Показана стратегия гейтирования для описания характеристик TIL (показана иерархия гейтирования) и данные расширенных фенотипических характеристик субпопуляции клеток CD4+ и субпопуляции клеток CD8+, полученных при двух опытных запусках примера варианта реализации процесса Gen 3.

[00325] **Фиг. 66:** Приведены данные анализа клеток ИФА ELISA с гранзимом B полученных при двух опытных запусках примера варианта реализации процесса Gen 3.

[00326] **Фиг. 67A-67B:** Схематическое представление примера варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00327] **Фиг. 68:** Схематическое представление примера варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00328] **Фиг. 69:** Сравнение Gen 2, Gen 2.1 и варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00329] **Фиг. 70:** Сравнение Gen 2, Gen 2.1 и варианта реализации процесса Gen 3 (16-дневный процесс).

[00330] **Фиг. 71:** Компоненты варианта реализации Gen 3.

[00331] **Фиг. 72:** Блок-схема сравнения вариантов реализации Gen 3(Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест).

[00332] **Фиг. 73:** Общее количество жизнеспособных клеток и кратность размножения для примеров вариантов реализации Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) при применении стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды.

[00333] **Фиг. 74:** показатели % жизнеспособности при реактивации, масштабировании культуры и сборе TIL для примеров вариантов реализации Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) при применении стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды.

[00334] **Фиг. 75:** Фенотипические характеристики итогового продукта TIL, полученного при обработке образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00335] **Фиг. 76:** Представлен анализ маркеров памяти для продукта TIL, полученного при обработке образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00336] **Фиг. 77:** Представлены маркеры активации и истощения TIL, продуцируемые при обработке образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS с последующей сортировкой клеток с гейтированием по CD4+.

[00337] **Фиг. 78:** Представлены маркеры активации и истощения TIL, продуцируемые при обработке образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS с последующей сортировкой клеток с гейтированием по CD8+.

[00338] **Фиг. 79:** представлены показатели продуцирования ИФН-γ (пг/мл) для итогового продукта TIL, полученного при обработке образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00339] **Фиг. 80:** Приведена концентрация ИЛ-2 (пг/мл) анализ отработанной среды (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и

бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00340] **Фиг. 81:** Приведена концентрация глюкозы (г/л) в отработанной среде (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00341] **Фиг. 82:** Приведена концентрация лактата (г/л) в отработанной среде (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00342] **Фиг. 83:** Приведена концентрация глутамина (ммоль/л) в отработанной среде (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00343] **Фиг. 84:** Приведена концентрация Glutamax (ммоль/л) в отработанной среде (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS.

[00344] **Фиг. 85:** Приведена концентрация аммиака (ммоль/л) в отработанной среде (собранной при реактивации, масштабирование культуры и сбор TIL) после обработки образцов опухолей L4063 и L4064 в примерах процессов Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS. Анализ длины теломер в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест). Анализ длины теломер для происходящих из опухолей с идентификационными номерами L4063 и L4064 клеток: величина относительной длины теломер (RTL) соответствует отношению средней флуоресценции теломер на хромосому/геном в клетках, полученных в процессах Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест к флуоресценции теломер на хромосому/геном в контрольной линии клеток (линия клеток лейкоза 1301) с применением набора DAKO.

[00345] **Фиг. 86:** анализ длины теломер на TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS. анализ длины теломер для происходящих из опухолей с идентификационными номерами L4063 и L4064 клеток : величина относительной длины теломер (RTL) соответствует отношению средней флуоресценции теломер на хромосому/геном в клетках, полученных в процессах Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1

Тест к флуоресценции теломер на хромосому/геном в контрольной линии клеток (линия клеток лейкоза 1301) с применением набора DAKO.

[00346] **Фиг. 87:** обзор репертуара TCR Vβ TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) с применением стандартной клеточной культуральной среды и бессывороточной клеточной культуральной среды CTS. Клональность TIL в итоговом продукте TIL, происходящих из опухолей с идентификационными номерами L4063 и L4064, полученном в процессах Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест на основании оценки репертуара TCR Vβ уникальных последовательностей CDR3.

[00347] **Фиг. 88:** Сравнение TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) применительно к частоте уникальных последовательностей CDR3 в собранном продукте TIL после обработки образцов опухоли L4063.

[00348] **Фиг. 89:** Сравнение TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) применительно к проценту общих уникальных последовательностей CDR3 в собранном клеточном продукте TIL после обработки образцов опухоли L4063: 975 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3.0 и тестового Gen 3.1, что эквивалентно 88% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 3.0, общих с итоговым продуктом тестового Gen 3.1.

[00349] **Фиг. 90:** Сравнение TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест), применительно к проценту общих уникальных последовательностей CDR3 в собранном клеточном продукте TIL после обработки образцов опухоли L4064: 2163 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3.0 и тестового Gen 3.1, что эквивалентно 87% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 3.0, общих с итоговым продуктом тестового Gen 3.1.

[00350] **Фиг. 91:** Сравнение TIL, продуцированных в примерах вариантов реализации процесса Gen 3 (Gen 3.0, Gen 3.1 Контроль, Gen 3.1 Тест) применительно к частоте уникальных последовательностей CDR3 в собранном продукте TIL после обработки образцов опухоли L4064.

[00351] **Фиг. 92:** Компоненты примера варианта реализации процесса Gen 3 (Gen 3 - Оптимизированный, 16-17-дневный процесс).

[00352] **Фиг. 93:** Таблица критериев приемлемости.

[00353] **Фиг. 94:** Подсчитанное количество клеток, день реактивации.

[00354] **Фиг. 95:** Подсчитанное количество клеток, день масштабирования.

[00355] **Фиг. 96:** Подсчитанное количество клеток, Сбор L4063.

[00356] **Фиг. 97:** Подсчитанное количество клеток, Сбор L4064.

[00357] **Фиг. 98:** Динамические данные.

[00358] **Фиг. 99:** Динамические данные.

[00359] **Фиг. 100:** Динамические данные.

[00360] **Фиг. 101:** Динамические данные.

[00361] **Фиг. 102:** Данные для продуцирования ИФН-γ фиг. 7 - L4063.

[00362] **Фиг. 103:** Данные для продуцирования ИФН-γ фиг. 7 - L4064.

[00363] **Фиг. 104:** Данные ИФА ELISA для концентрации ИЛ-2.

[00364] **Фиг. 105:** Сводная таблица данных метаболического анализа.

[00365] **Фиг. 106:** Сводные данные.

[00366] **Фиг. 107:** Сводные данные.

[00367] **Фиг. 108:** Индекс разнообразия Шеннона.

[00368] **Фиг. 109:** Схема примера процесса 2A с общим описанием этапов A-F.

[00369] **Фиг. 110:** Структуры I-A и I-B, цилиндры соответствуют индивидуальным связывающим полипептиды доменам. Структуры I-A и I-B содержат три линейно соединенных связывающих TNFRSF домена, происходящих из например, 4-1BBL или антитела, которое связывает 4-1BB, которые при укладке образуют тривалентный белок, который затем соединяется со вторым тривалентным белком через IgG1-Fc (включая домены CH3 и CH2), который таким образом используется для соединения двух тривалентных белков дисульфидными связями (небольшие вытянутые овалы), стабилизируя структуру и обеспечивая наличие агонистов, способных удерживать вместе внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием сигнального комплекса. Изображенные в виде цилиндров связывающие TNFRSF домены могут представлять собой scFv-домены, содержащие, например, цепи VH и VL, соединенные линкером, который может содержать гидрофильные остатки и последовательности Gly и Ser для гибкости, а также Glu и Lys для растворимости.

[00370] **Фиг. 111: Общее описание процессов Gen 2 и Gen 3 с применением образцов биопсии.**

[00371] **Фиг. 112: Пример варианта реализации процессов Gen 3.**

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[00372] SEQ ID NO:1 представляет собой последовательность аминокислот тяжелой цепи муромонаба.

[00373] SEQ ID NO:2 представляет собой последовательность аминокислот легкой цепи муромонаба.

[00374] SEQ ID NO:3 представляет собой последовательность аминокислот рекомбинантного белка ИЛ-2 человека.

[00375] SEQ ID NO:4 представляет собой последовательность аминокислот альдеслейкина.

[00376] SEQ ID NO:5 представляет собой последовательность аминокислот рекомбинантного белка ИЛ-4 человека.

[00377] SEQ ID NO:6 представляет собой последовательность аминокислот рекомбинантного белка ИЛ-7 человека.

[00378] SEQ ID NO:7 представляет собой последовательность аминокислот

рекомбинантного белка ИЛ-15 человека.

[00379] SEQ ID NO:8 представляет собой последовательность аминокислот рекомбинантного белка ИЛ-21 человека.

[00380] SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность аминокислот 4-1BB человека.

[00381] SEQ ID NO:10 представляет собой последовательность аминокислот 4-1BB мыши.

[00382] SEQ ID NO:11 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00383] SEQ ID NO:12 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00384] SEQ ID NO:13 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (VH) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00385] SEQ ID NO:14 представляет собой вариабельную область легкой цепи (VL) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00386] SEQ ID NO:15 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00387] SEQ ID NO:16 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00388] SEQ ID NO:17 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00389] SEQ ID NO:18 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00390] SEQ ID NO:19 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00391] SEQ ID NO:20 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB утомилумаба (PF-05082566).

[00392] SEQ ID NO:21 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00393] SEQ ID NO:22 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00394] SEQ ID NO:23 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00395] SEQ ID NO:24 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00396] SEQ ID NO:25 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00397] SEQ ID NO:26 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00398] SEQ ID NO:27 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического

моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00399] SEQ ID NO:28 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00400] SEQ ID NO:29 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00401] SEQ ID NO:30 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к 4-1BB урелумаба (BMS-663513).

[00402] SEQ ID NO:31 представляет собой Fc-домен слитого белка - агониста TNFRSF.

[00403] SEQ ID NO:32 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00404] SEQ ID NO:33 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00405] SEQ ID NO:34 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00406] SEQ ID NO:35 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00407] SEQ ID NO:36 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00408] SEQ ID NO:37 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00409] SEQ ID NO:38 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00410] SEQ ID NO:39 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00411] SEQ ID NO:40 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00412] SEQ ID NO:41 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00413] SEQ ID NO:42 представляет собой Fc-домен слитого белка - агониста TNFRSF.

[00414] SEQ ID NO:43 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00415] SEQ ID NO:44 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00416] SEQ ID NO:45 представляет собой линкер для слитого белка - агониста TNFRSF.

[00417] SEQ ID NO:46 представляет собой последовательность аминокислот лиганда 4-1BB (4-1BBL).

[00418] SEQ ID NO:47 представляет собой растворимую часть полипептида 4-

1BBL.

[00419] SEQ ID NO:48 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1, вариант 1.

[00420] SEQ ID NO:49 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1, вариант 1.

[00421] SEQ ID NO:50 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1, вариант 2.

[00422] SEQ ID NO:51 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB 4B4-1-1, вариант 2.

[00423] SEQ ID NO:52 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического антитела к 4-1BB H39E3-2.

[00424] SEQ ID NO:53 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического антитела к 4-1BB H39E3-2.

[00425] SEQ ID NO:54 представляет собой последовательность аминокислот OX40 человека.

[00426] SEQ ID NO:55 представляет собой последовательность аминокислот OX40 мыши.

[00427] SEQ ID NO:56 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00428] SEQ ID NO:57 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00429] SEQ ID NO:58 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00430] SEQ ID NO:59 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00431] SEQ ID NO:60 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00432] SEQ ID NO:61 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00433] SEQ ID NO:62 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00434] SEQ ID NO:63 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00435] SEQ ID NO:64 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00436] SEQ ID NO:65 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 таволиксизумаба (MEDI-0562).

[00437] SEQ ID NO:66 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00438] SEQ ID NO:67 представляет собой легкую цепь агонистического

моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00439] SEQ ID NO:68 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00440] SEQ ID NO:69 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00441] SEQ ID NO:70 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00442] SEQ ID NO:71 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00443] SEQ ID NO:72 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00444] SEQ ID NO:73 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00445] SEQ ID NO:74 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00446] SEQ ID NO:75 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 11D4.

[00447] SEQ ID NO:76 представляет собой тяжелую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00448] SEQ ID NO:77 представляет собой легкую цепь агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00449] SEQ ID NO:78 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00450] SEQ ID NO:79 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00451] SEQ ID NO:80 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00452] SEQ ID NO:81 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00453] SEQ ID NO:82 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00454] SEQ ID NO:83 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00455] SEQ ID NO:84 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00456] SEQ ID NO:85 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 18D8.

[00457] SEQ ID NO:86 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00458] SEQ ID NO:87 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L)

агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00459] SEQ ID NO:88 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00460] SEQ ID NO:89 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00461] SEQ ID NO:90 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00462] SEQ ID NO:91 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00463] SEQ ID NO:92 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00464] SEQ ID NO:93 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu119-122.

[00465] SEQ ID NO:94 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00466] SEQ ID NO:95 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00467] SEQ ID NO:96 представляет собой CDR1 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00468] SEQ ID NO:97 представляет собой CDR2 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00469] SEQ ID NO:98 представляет собой CDR3 тяжелой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00470] SEQ ID NO:99 представляет собой CDR1 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00471] SEQ ID NO:100 представляет собой CDR2 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00472] SEQ ID NO:101 представляет собой CDR3 легкой цепи агонистического моноклонального антитела к OX40 Hu106-222.

[00473] SEQ ID NO:102 представляет собой последовательность аминокислот лиганда OX40 (OX40L).

[00474] SEQ ID NO:103 представляет собой растворимую часть полипептида OX40L.

[00475] SEQ ID NO:104 представляет собой вариант растворимой части полипептида OX40L.

[00476] SEQ ID NO:105 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 008.

[00477] SEQ ID NO:106 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 008.

[00478] SEQ ID NO:107 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи

(V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 011.

[00479] SEQ ID NO:108 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 011.

[00480] SEQ ID NO:109 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 021.

[00481] SEQ ID NO:110 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 021.

[00482] SEQ ID NO:111 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40 023.

[00483] SEQ ID NO:112 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40 023.

[00484] SEQ ID NO:113 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00485] SEQ ID NO:114 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00486] SEQ ID NO:115 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00487] SEQ ID NO:116 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00488] SEQ ID NO:117 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00489] SEQ ID NO:118 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00490] SEQ ID NO:119 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00491] SEQ ID NO:120 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00492] SEQ ID NO:121 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00493] SEQ ID NO:122 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00494] SEQ ID NO:123 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00495] SEQ ID NO:124 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) гуманизированного агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00496] SEQ ID NO:125 представляет собой вариабельную область тяжелой цепи (V_H) агонистического моноклонального антитела к OX40.

[00497] SEQ ID NO:126 представляет собой вариабельную область легкой цепи (V_L) агонистического моноклонального антитела к OX40.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[00498] Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют значения, общепринятые среди специалистов в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Все патенты и публикации, упоминаемые в настоящем документе, полностью включены в него посредством ссылок.

[00499] Термин «in vivo» относится к событию, которое происходит а организме субъекта.

[00500] Термин «in vitro» относится к событию, которое происходит вне организма субъекта. Анализы in vitro включают анализы на основе клеток, в которых задействованы живые или мертвые клетки, а также могут включать бесклеточный анализ, в котором не задействованы интактные клетки.

[00501] Термин «ex vivo» относится к событию, которое включает обработку (лечение) или осуществление процедуры на клетке, ткани и/или органе, извлеченных из организма субъекта. Указанные клетка, ткань и/или орган могут быть возвращены в организм субъекта соответствующим хирургическим или лечебным способом.

[00502] Термин «быстрое размножение» означает увеличение количества антиген-специфических TIL по меньшей мере приблизительно в 3 раза (или в 4, 5, 6, 7, 8 или 9 раз) за период продолжительностью 1 неделя, более предпочтительно по меньшей мере в 10 раз (или в 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90 раз) за период продолжительностью 1 неделя; или, наиболее предпочтительно, по меньшей мере приблизительно в 100 раз за период продолжительностью 1 неделя. Ниже представлен ряд протоколов быстрого размножения.

[00503] «Инфильтрирующие опухоль лимфоциты» или «TIL» в настоящем документе означают популяцию клеток, исходно взятую в виде лейкоцитов, покинувших кровоток субъекта и мигрировавших в опухоль. TIL включают, не ограничиваясь перечисленными, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), $CD4^+$ Т-клетки Th1 и Th17, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. «Первичные TIL» представляют собой TIL, которые взяты из образцов тканей пациента согласно описанию в настоящем документе (иногда называемые «свежеполученными» или «свежевыделенными»), а «вторичные TIL» представляют собой любые популяции клеток TIL, которые были размножены или пролиферированы согласно описанию в настоящем документе, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, смешанные культуры TIL и размноженные TIL («REP TIL» или «пост-REP TIL»). Популяции клеток TIL могут включать генетически модифицированные TIL.

[00504] «Популяция клеток» (в том числе TIL) в настоящем документе означает некоторое количество клеток, имеющих общие признаки. В общем случае количество клеток в популяциях обычно варьирует от 1×10^6 до 1×10^{10}, при этом разные популяции TIL содержат разное количество клеток. Например, начальный рост первичных TIL в присутствии ИЛ-2 приводит к получению популяции смешанных TIL размером примерно 1×10^8 клеток. Размножение REP обычно проводят для получения популяций размером от

$1,5 \times 10^9$ до $1,5 \times 10^{10}$ клеток для инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации размножение REP проводят для получения популяций размером $2,3 \times 10^{10}$-$13,7 \times 10^{10}$.

[00505] «Криоконсервированные TIL» в настоящем документе означает, что TIL, первичные, смешанные или размноженные (REP TIL), обрабатывают и хранят в диапазоне от приблизительно -150°C до -60°C. Общие способы криоконсервации также описаны в других разделах настоящего документа, в том числе в разделе примеров. Для ясности отметим, что «криоконсервированные TIL» отличаются от замороженных образцов тканей, которые могут применяться в качестве источника первичных TIL.

[00506] «Размороженные криоконсервированные TIL» в настоящем документе означают популяцию TIL, которая ранее была криоконсервирована и затем обработана для возвращения в условия комнатной или более высокой температуры, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, в условия температур культивирования клеток или температур, при которых TIL могут быть введены пациенту.

[00507] TIL, как правило, могут быть либо биохимически, с использованием маркеров клеточной поверхности, либо функционально, по способности инфильтрировать опухоли и обеспечивать лечение. TIL могут быть, как правило, разделены на категории на основании экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Кроме того, как вариант, TIL могут быть функционально определены по способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту.

[00508] Термин «среда для криоконсервации» или «среда для криоконсервации» относится к любой среде, которая может применяться для криоконсервации клеток. Такие среды могут включать среды, содержащие от 7% до 10% ДМСО. Примеры сред включают CryoStor CS10, Hyperthermasol, а также их комбинации. Термин «CS10» относится к среде для криоконсервации, которую приобретают у Stemcell Technologies или Biolife Solutions. Для среды CS10 может использоваться торговое наименование «CryoStor® CS10». Среда CS10 представляет собой бессывороточную, не содержащую компонентов животного происхождения среду, которая содержит ДМСО.

[00509] Термин «Т-клетка центральной памяти» относится к подгруппе Т-клеток, у человека являющихся CD45R0+ и конститутивно экспрессируют CCR7 ($CCR7^{hi}$) и CD62L ($CD62^{hi}$). Фенотип поверхности Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (ИЛ-7R) и ИЛ-15R. Транскрипционные факторы для Т-клеток центральной памяти включают BCL-6, BCL-6B, MBD2 и BMI1. Т-клетки центральной памяти в первую очередь секретируют ИЛ-2 и CD40L в качестве эффекторных молекул после запуска TCR. Т-клетки центральной памяти преобладают в CD4-компартменте в крови, и у человека их концентрация пропорционально повышена в лимфатических узлах и миндалинах.

[00510] Термин «эффекторная Т-клетка памяти» относится к подгруппе Т-клеток человека или млекопитающих, которые, как и Т-клетки центральной памяти, являются CD45R0+, однако утратили способность к конститутивной экспрессии CCR7 ($CCR7^{lo}$) и отличаются гетерогенной или незначительной экспрессией CD62L ($CD62L^{lo}$). Фенотип

поверхности Т-клеток центральной памяти также включает TCR, CD3, CD127 (ИЛ-7R) и ИЛ-15R. Транскрипционные факторы для Т-клеток центральной памяти включают BLIMP1. Эффекторные Т-клетки памяти быстро секретируют высокие уровни воспалительных цитокинов после антигенной стимуляции, в том числе интерферон-γ, ИЛ-4 и ИЛ-5. Эффекторные Т-клетки памяти преобладают в CD8-компартменте в крови, и у человека их концентрация пропорционально повышена в легких, печени и кишечнике. CD8+ эффекторные Т-клетки памяти содержат значительные количества перфорина.

[00511] Термин «закрытая система» относится к системе, закрытой от внешней среды. Любая закрытая система, подходящая для применения в способах культивирования клеток, может применяться в способах согласно настоящему изобретению. Закрытые системы включают, например, закрытые G-контейнеры, однако не ограничиваются ими. После добавления сегмента опухоли в закрытую систему ее не открывают для внешней среды до тех пор, пока TIL не будут готовы для введения пациенту.

[00512] Термины «фрагментирование», «фрагмент» и «фрагментированный» в настоящем документе используют для описания процессов разрушения опухоли, включая способы механической фрагментации, такие как дробление, разрезание, разделение и морцелляция опухолевой ткани, а также любой другой способ разрушения физической структуры опухолевой ткани.

[00513] Термин «тонкоигольный аспират», или FNA относится к типу процедуры биопсии, которая может применяться для взятия образцов или диагностических процедур, в том числе взятия образцов опухоли, при котором берут образец, но опухоль не удаляют или не резецируют. При тонкоигольной аспирации полую иглу, например, 25-18 калибра, вводят в опухоль или в область, содержащую указанную опухоль, и забирают жидкость и клетки (в том числе ткань) для дальнейшего анализа или размножения, согласно описанию в настоящем документе. При FNA клетки извлекают без сохранения гистологической архитектуры клеток ткани. FNA может содержать TIL. В некоторых случаях тонкоигольную аспирационную биопсию осуществляют с применением иглы для тонкоигольной аспирационной биопсии под ультразвуковым контролем. Иглы для FNA коммерчески доступны от Becton Dickinson, Covidien, и т.п.

[00514] Термин «трепанобиопсии» или «толстоигольная биопсия» относится к типу процедуры биопсии, которая может применяться для взятия образцов или диагностических процедур, в том числе взятия образцов опухоли, при котором берут образец, но опухоль не удаляют или не резецируют. При трепанобиопсии, полую иглу, например, 16-11 калибра, вводят в опухоль или в область, содержащую указанную опухоль, и забирают жидкость и клетки (в том числе ткань) для дальнейшего анализа или размножения, согласно описанию в настоящем документе. При трепанобиопсии клетки могут быть извлечены с сохранением гистологической архитектуры клеток ткани до определенной степени, благодаря большему размеру иглы по сравнению с FNA. Игла для трепанобиопсии обычно имеет размер, позволяющий сохранить по меньшей мере некоторую часть гистологической архитектуры опухоли. Трепанобиоптат может

содержать TIL. В некоторых случаях толстоигольную биопсию осуществляют с применением инструмента для биопсии, инструмента для вакуумной толстоигольной биопсии, инструмента для стереотаксической толстоигольной биопсии, инструмента для толстоигольной биопсии под ультразвуковым контролем, инструмента для толстоигольной биопсии под контролем МРТ, коммерчески доступных от Bard Medical, Becton Dickinson, и т.п.

[00515] Термины «мононуклеарные клетки периферической крови» и «МКПК» относится к клеткам периферической крови с круглым ядром, в том числе лимфоцитам (Т-клеткам, В-клеткам, NK-клеткам) и моноцитам. При использовании в качестве антигенпрезентирующих клеток (МКПК представляют собой тип антигенпрезентирующих клеток) мононуклеарные клетки периферической крови представляют собой облученные аллогенные мононуклеарные клетки периферической крови.

[00516] Термины «лимфоциты периферической крови» и «ЛПК» относятся к Т-клеткам, размноженным из периферической крови. Согласно некоторым вариантам реализации ЛПК выделяют из цельной крови или продукта афереза от донора. Согласно некоторым вариантам реализации ЛПК выделяют из цельной крови или продукта афереза от донора путем положительного или отрицательного отбора по Т-клеточному фенотипу, например, Т-клеточный фенотип CD3+ CD45+.

[00517] Термин «антитело против CD3» относится к антителу или его варианту, *например,* моноклональному антителу и включает антитела человека, гуманизированные, химерные или мышиные антитела, направленные против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток. Антитела против CD3 включают OKT-3, также известный как муромонаб. Антитела против CD3 также включают клон UHCT1, также известный как T3 и CD3ε. Другие антитела против CD3 включают, например, отеликсизумаб, теплизумаб и визилизумаб.

[00518] Термин «OKT-3» (также называемый в настоящем документе «OKT3») относится к моноклональному антителу или его биоаналогу или варианту, в том числе антителам человека, гуманизированным, химерным или мышиным антителам, направленным против рецептора CD3 в Т-клеточном антигенном рецепторе зрелых Т-клеток, и включают коммерчески доступные формы, такие как OKT-3 (30 нг/мл, MACS GMP CD3 pure, Miltenyi Biotech, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США) и муромонаб или его варианты, формы с консервативными заменами аминокислот, гликоформы или биоаналоги. Последовательности аминокислот тяжелых и легких цепей муромонаба приведены в таблице 1 (SEQ ID NO:1 и SEQ ID NO:2). Гибридома, способная продуцировать OKT-3, депонирована в Американской коллекции типовых культур и ей присвоен номер доступа в ATCC CRL 8001. Гибридома, способная продуцировать OKT-3, также депонирована в Европейской коллекции аутентифицированных клеточных культур (ECACC) и ей присвоен номер в каталоге 86022706.

ТАБЛИЦА 1. Последовательности аминокислот муромонаба.

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

[00519] Термин «ИЛ-2» (также называемый в настоящем документе «ИЛ2») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-2, и включает все формы ИЛ-2, в том числе формы человека и млекопитающих, формы с консервативными заменами аминокислот, гликоформы, биоаналоги и варианты. ИЛ-2 описан, *например*, в Nelson, J. Immunol. **2004,** 172, 3983-88 и Malek, *Анну. Rev.* Immunol. **2008,** 26, 453-79, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки. Последовательность аминокислот рекомбинантного ИЛ-2 человека, подходящая для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID: 3). Например, термин ИЛ-2 охватывает человеческие рекомбинантные формы ИЛ-2, такие как альдеслейкин (PROLEUKIN, коммерчески доступен от множества поставщиков в количестве 22 миллионов МЕ на одноразовые флаконы), а также форму коммерчески поставляемого рекомбинантного ИЛ-2. компанией CellGenix, Inc., Портсмут, Нью-

Джерси, США (CELLGRO GMP) или ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, Нью-Джерси, США (кат. № CYT-209-b) и другие коммерческие эквиваленты от других поставщиков. Альдеслейкин (дез-аланил-1, серин-125 ИЛ-2 человека) представляет собой негликозилированную рекомбинантную форму ИЛ-2 человека с молекулярной массой приблизительно 15 кДа. Последовательность аминокислот альдеслейкина, подходящая для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO: 4). Термин ИЛ-2 также охватывает пегилированные формы ИЛ-2 согласно описанию в настоящем документе, в том числе пегилированное пролекарство NKTR-214, доступное от Nektar Therapeutics, Южный Сан-Франциско, Калифорния, США. NKTR-214 и пегилированный ИЛ-2, которые подходят для применения согласно настоящему изобретению, описаны в опубликованной заявке на патент США № US 2014/0328791 A1 и опубликованной международной заявке на патент WO 2012/065086 A1, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Альтернативные формы конъюгированных ИЛ-2, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, описаны в патентах США № 4766106, №5206344, №5089261 и №4902502, содержание которых включено посредством ссылок в настоящий документ. Составы с ИЛ-2, которые подходят для применения согласно настоящему изобретению, описаны в патенте США № 6706289, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ.

ТАБЛИЦА 2. Последовательности аминокислот интерлейкинов.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:3 рекомбинантный ИЛ-2 человека (рчИЛ-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN 120 RWITFCQSII STLT 134
SEQ ID NO:4 Альдеслейкин	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE 60 ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 120 ITFSQSIIST LT 132
SEQ ID NO:5 рекомбинантный ИЛ-4 человека (рчИЛ-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH 60 EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI 120 MREKYSKCSS 130
SEQ ID NO:6 рекомбинантный	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA 60

ИЛ-7 человека (рчИЛ-7)	ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL 120 KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH 153
SEQ ID NO:7 рекомбинантный ИЛ-15 человека (рчИЛ-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI 60 HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS 115
SEQ ID NO:8 рекомбинантный ИЛ-21 человека (рчИЛ-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG 60 NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ 120 HLSSRTHGSE DS 132

[00520] Термин «ИЛ-4» (также в настоящем документе называемый «ИЛ4») относится к цитокину, известному как интерлейкин 4, который продуцируют Т-клетки Th2, а также эозинофилы, базофилы и тучные клетки. ИЛ-4 регулирует дифференцировку необученных хелперных Т-клеток (клеток Th0) в Т-клетки Th2. Steinke and Borish, *Респир.* Res. **2001,** 2, 66-70. После активации ИЛ-4 Т-клетки Th2 впоследствии продуцируют дополнительный ИЛ-4 в рамках петли положительной обратной связи. ИЛ-4 также стимулирует пролиферацию В-клеток и экспрессию MHC II класса, а также индуцирует переключение классов для экспрессии IgE и IgG_1 В-клетками. Рекомбинантный человеческий ИЛ-4, подходящий для использования в изобретении, коммерчески доступен от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, Нью-Джерси, США (Cat. № CYT-211) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок ИЛ-15 человека, кат. № Gibco CTP0043). Последовательность аминокислот рекомбинантного ИЛ-4 человека, подходящего для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO:5).

[00521] Термин «ИЛ-7» (также называемый в настоящем документе «ИЛ7») относится к гликозилированному тканевому цитокину, известному как интерлейкин 7, который может быть получен из стромальных и эпителиальных клеток, а также из дендритных клеток. Fry and Mackall, Blood **2002,** 99, 3892-904. ИЛ-7 может стимулировать развитие Т-клеток. ИЛ-7 связывается с рецептором ИЛ-7, гетеродимером, состоящим из рецептора ИЛ-7 альфа и рецептора общей гамма-цепи, что обеспечивает серию сигналов, важных для развития Т-клеток в вилочковой железе и выживания на периферии. Рекомбинантный человеческий ИЛ-7, подходящий для использования в изобретении, коммерчески доступен от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, Нью-Джерси, США (Cat. № CYT-254) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок ИЛ-15 человека, кат. № Gibco PHC0071). Последовательность аминокислот рекомбинантного ИЛ-7 человека,

подходящего для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO:6).

[00522] Термин «ИЛ-15» (также называемый в настоящем документе «ИЛ15») относится к фактору роста Т-клеток, известному как интерлейкин-15, и включает все формы ИЛ-2, в том числе формы человека и млекопитающих, с консервативными заменами аминокислот, гликоформы, биоаналоги и их варианты. ИЛ-15 описан, *например,* в источнике: Fehniger и Caligiuri, Blood **2001,** 97, 14-32, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ. ИЛ-15 содержит общие с ИЛ-2 сигнальные субъединицы рецептора β и γ. Рекомбинантный ИЛ-15 человека представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 114 аминокислот (и N-концевой метионин) с молекулярной массой 12,8 кДа. Рекомбинантный человеческий ИЛ-15 коммерчески доступен от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, Нью-Джерси, США (Cat. № CYT-230-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок ИЛ-15 человека, кат. № 34-8159-82). Последовательность аминокислот рекомбинантного человека ИЛ-15, подходящего для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO:7).

[00523] Термин «ИЛ-21» (также называемый в настоящем документе «ИЛ21») относится к плейотропному белку-цитокину, известному как интерлейкин-21, и включает все формы ИЛ-21, в том числе формы человека и млекопитающих, консервативные замен аминокислот, гликоформы, биоаналоги и их варианты. ИЛ-21 описан, *например*, в Spolski и Leonard, *Nat. Rev. Drug. Диск.* **2014,** 13, 379-95, раскрытие которых включено сюда в качестве ссылки. ИЛ-21 в первую очередь продуцируют естественные киллерные Т-клетки и активированные $CD4^+$ Т-клетки человека. Рекомбинантный ИЛ-21 человека представляет собой одиночную негликозилированную полипептидную цепь, содержащую 132 аминокислоты, с молекулярной массой 15,4 кДа. Рекомбинантный человеческий ИЛ-21 коммерчески доступен от множества поставщиков, включая ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Ист-Брансуик, Нью-Джерси, США (Cat. № CYT-408-b) и ThermoFisher Scientific, Inc., Уолтем, Массачусетс, США (рекомбинантный белок ИЛ-21 человека, кат. № 14-8219-80). Последовательность аминокислот рекомбинантного ИЛ-21 человека, подходящая для применения согласно настоящему изобретению, приведена в таблице 2 (SEQ ID NO:8).

[00524] Если упоминается «эффективное противоопухолевое количество», «ингибирующее опухоль эффективное количество» или «терапевтическое количество», это означает, что точное количество композиций согласно настоящему изобретению для введения может быть определено лечащим врачом с учетом индивидуальных особенностей возраста, массы тела, размера опухоли, степени инфекции или метастазирования, и состояния пациента (субъекта). В общем случае можно сказать, что фармацевтическая композиция, содержащая инфильтрирующие опухоль лимфоциты (*например,* вторичные TIL или генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты), описанная в настоящем документе, может вводиться в дозировке от 10^4 до

10^{11} клеток/кг массы тела (*например, от* 10^5 до 10^6, от 10^5 до 10^{10}, от 10^5 до 10^{11}, от 10^6 до 10^{10}, от 10^6 до 10^{11}, от 10^7 до 10^{11}, от 10^7 до 10^{10}, от 10^8 до 10^{11}, от 10^8 до 10^{10}, от 10^9 до 10^{11} или от 10^9 до 10^{10} клеток/кг массы тела), в том числе в дозировке, равной любым целочисленным значениям в пределах указанных диапазонов. Композиции с инфильтрирующими опухоль лимфоцитами (включая, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) могут также быть введены многократно в указанных дозировках. Инфильтрирующие опухоль лимфоциты (в том числе, в некоторых случаях, генетически модифицированные цитотоксические лимфоциты) могут быть введены с применением методик инфузии, общеизвестных в области иммунотерапии (см., например, Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988). Специалист в данной области медицины сможет легко определить оптимальные дозировку и режим лечения для конкретного пациента путем мониторинга признаков заболевания у пациента соответствующей корректировки лечения.

[00525] Термин «злокачественное гематологическое заболевание», «гематологическое злокачественное заболевание» или термины со сходным значением относятся к раку и опухолям кроветворных и лимфоидных тканей млекопитающих, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, тканей крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные заболевания также называют «жидкими опухолями». Гематологические злокачественные заболевания включают, не ограничивая перечисленными, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (АМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМЛ), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин «В-клеточное злокачественное гематологическое заболевание» относится к гематологическим злокачественным заболеваниям, поражающим В-клетки.

[00526] Термин «солидная опухоль» относится к аномальному тканевому образованию, которое обычно не включает кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «рак в виде солидной опухоли» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Рак в виде солидной опухоли включает, не ограничиваясь перечисленными, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, молочной железы, предстательной железы, толстой кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включающие паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых рассредоточены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00527] Термин «жидкая опухоль» относится к аномальному образованию из клеток, текучему по природе. Рак с жидкими опухолями включает, не ограничиваясь перечисленным, лейкемии, миеломы и лимфомы, а также другие гематологические злокачественные образования. TIL, взятые из жидких опухолей, могут также называться в

настоящем документе инфильтрирующими костным мозг лимфоцитами (MIL). TIL, взятые из жидких опухолей, в том числе жидкие опухоли, циркулирующие в периферической крови, могут также называться в настоящем документе «ЛПК». Термины MIL, TIL и ЛПК используются в настоящем документе взаимозаменяемо и различаются только типом ткани, из которой происходят клетки.

[00528] Термин «микроокружение» в настоящем документе может относиться к микроокружению твердой или гематологической опухоли в целом или к индивидуальной подгруппе клеток внутри микроокружения. Микроокружение опухоли в настоящем документе относится к комплексной смеси «клеток, растворимых факторов, сигнальных молекул, внеклеточных матриксов и механических стимулов, которые способствуют неопластической трансформации, поддерживают рост опухоли и инвазию, защищают опухоль от иммунитета хозяина, благоприятствуют терапевтической резистентности и создают ниши для успешного развития доминирующих метастазов» согласно описанию в источнике: Swartz, et al., Cancer Res., **2012,** 72, 2473. Хотя опухоли экспрессируют антигены, которые должны распознаваться Т-клетками, устранение опухоли иммунной системой происходит редко из-за подавления иммунитета микроокружением.

[00529] Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака популяцией TIL, при котором у пациента предварительно проводят немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией TIL в соответствии с настоящим изобретением. Согласно некоторым вариантам реализации может быть предложена популяция TIL, причем у пациента предварительно проводят немиелоаблативную химиотерапию перед инфузией TIL в соответствии с настоящим изобретением. Согласно варианту реализации указанная немиелоаблативная химиотерапия представлена 60 мг/кг/сутки циклофосфамида на протяжении двух дней (дни 27 и 26 до инфузии TIL) и 25 мг/м2/сутки флударабина на протяжении 5 дней (дни 27-23 до инфузии TIL). Согласно варианту реализации после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (на 0 день) в соответствии с настоящим изобретением пациенту внутривенно инфузируют ИЛ-2 в дозировке 720 000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности.

[00530] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет элиминации регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («цитокиновых стоков»). Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения используется этап лимфодеплеции (иногда также называемый «иммуносупрессивным кондиционированием») у пациента до введения rTIL согласно настоящему изобретению.

[00531] Термины «совместное введение», «вводить в комбинации», «введение в комбинации», «одновременно» и «параллельно» в настоящем документе включают введение двух или более активных фармацевтических ингредиентов (согласно предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения, например, по меньшей мере одного агониста калиевых каналов в комбинации с множеством TIL) субъекту, так

что оба активных фармацевтических ингредиента и/или их метаболита присутствуют в организме субъекта в одно и то же время. Совместное введение включает одновременное введение в виде отдельных композиций, введение в разное время в виде отдельных композиций или введение в виде композиции, в которой присутствуют два или более активных фармацевтических ингредиентов. Одновременное введение в виде отдельных композиций и введение в виде композиции, в которой присутствуют оба агента, являются предпочтительными.

[00532] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству соединения или комбинации соединений согласно описанию в настоящем документе, достаточному для реализации предполагаемого применения, в том числе, но не ограничиваясь указанным, лечения заболевания. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от предполагаемого применения (in vitro или in vivo) или субъекта и болезненного состояния, лечение которого проводят (*например,* от массы тела, возраста и пола субъекта), тяжести болезненного состояния или способа введения. Термин также используют для дозы, которая индуцирует определенный ответ в целевых клетках (*например*, снижение адгезии тромбоцитов и/или миграция клеток). Конкретная доза будет варьировать в зависимости от выбранных конкретных соединений, нужного режима дозирования, введения соединения в комбинации с другими соединениями, расписания введения, ткани, куда их вводят, и физической системы доставки, которая переносит соединение.

[00533] Термины «лечение», «лечить» и т.п. относятся к получению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Указанный эффект может быть профилактическим в смысле полного или частичного предотвращения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим в смысле частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с указанным заболеванием. «Лечение» в настоящем описании означает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (a) предотвращение возникновения указанного заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к указанному заболеванию, но у которого оно еще не диагностировано; (b) ингибирование указанного заболевания, *т.е.* остановка его развития или прогрессирования; и (c) облегчение указанного заболевания, т.е. обеспечение регресса заболевания и/или облегчения одного или нескольких симптомов заболевания. «Лечение» также предусматривает доставку агента для обеспечения фармакологического эффекта даже при отсутствии заболевания или состояния. Например, «лечение» предусматривает доставку композиции, которая может вызывать иммунный ответ или обеспечивать иммунитет при отсутствии болезненного состояния, как, *например*, в случае вакцины.

[00534] Термин «гетерологичный» в отношении частей нуклеиновой кислоты или белка означает, что указанная нуклеиновая кислота или указанный белок содержит две или более подпоследовательности, которые не взаимосвязаны таким образом в природе. Например, нуклеиновая кислота, полученная рекомбинантным способом, обычно

содержит две или более последовательности из неродственных генов, организованные так, чтобы образовалась новая функциональная нуклеиновая кислота, например, промотор из одного источника и кодирующую область из другого источника, или кодирующие области из разных источников. Аналогичным образом, гетерологичный белок означает, что указанный белок содержит две или более подпоследовательностей, которые не взаимосвязаны таким образом в природе (*например*, слитый белок).

[00535] Термины «идентичность последовательностей», «процент идентичности» и «процент идентичности последовательностей» (или их синонимы, например, «99% идентичности») в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидов относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, одинаковым или содержащим определенный процент одинаковых нуклеотидов или остатков аминокислот при сравнении и выравнивании (с введением пропусков, если это необходимо) для достижения максимального соответствия, без учета каких-либо консервативных замен аминокислот, которые предусмотрены определением идентичности последовательностей. Процент идентичности можно измерить с помощью программного обеспечения или алгоритмов сравнения последовательностей, либо путем визуального исследования. В данной области известны различные алгоритмы и программное обеспечение, которые можно использовать для выравнивания последовательностей аминокислот или нуклеотидов. Подходящие программы для определения процента идентичности последовательностей включают, например, комплекс программ BLAST, доступных на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США. Сравнение двух последовательностей может быть выполнено с использованием алгоритма BLASTN или BLASTP. BLASTN используют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, а BLASTP используют для сравнения последовательностей аминокислот ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, Калифорния) или MegAlign, доступные от DNASTAR, являются дополнительными общедоступными программами, которые могут быть использованы для выравнивания последовательностей. Специалист в данной области техники сможет определить подходящие параметры для максимального выравнивания при применении конкретного программного обеспечения для выравнивания. Согласно некоторым вариантам реализации используют параметры программного обеспечения для выравнивания, установленные по умолчанию.

[00536] в настоящем документе термин «вариант» охватывает, не ограничиваясь перечисленным, белки, антитела или слитые белки, которые содержат последовательность аминокислот, которая отличается от аминокислотной последовательности референсного белка, антитела или слитого белка одной или несколькими заменами, делециями и/или добавлениями в определенных положениях внутри аминокислотной последовательности или рядом с аминокислотной последовательностью референсного антитела, белка или слитого белка. Вариант может содержать в последовательности аминокислот одну или несколько консервативных замен по сравнению с последовательностью аминокислот

референсного антитела. Консервативные замены могут включать, *например*, замену аналогично заряженными или незаряженными аминокислотами. Вариант сохраняет способность специфически связываться с антигеном референсного антитела, белка или слитого белка. Термин «вариант» также включает пегилированные антитела или белки.

[00537] «Инфильтрирующие опухоль лимфоциты» или «TIL» в настоящем документе означают популяцию клеток, исходно взятую в виде лейкоцитов, покинувших кровоток субъекта и мигрировавших в опухоль. TIL включают, не ограничиваясь перечисленными, цитотоксические $CD8^+$ Т-клетки (лимфоциты), $CD4^+$ Т-клетки Th1 и Th17, естественные клетки-киллеры, дендритные клетки и макрофаги M1. TIL включают как первичные, так и вторичные TIL. «Первичные TIL» представляют собой TIL, взятые из образцов тканей пациента, как описано в настоящем документе (иногда называемые «свежеполученными» или «свежевыделенными»), а «вторичные TIL» представляют собой любые популяции клеток TIL, размноженные или пролиферированные, как описано в настоящем документе, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, смешанные TIL, размноженные TIL («REP TIL»), а также «reREP TIL», описанные в настоящем документе. reREP TIL могут включать, например, TIL после второго размножения или второго дополнительного размножения (например, описанные для этапа D на фиг. 1, в том числе TIL, называемые reREP TIL).

[00538] TIL, как правило, могут быть определены либо биохимически, с использованием маркеров клеточной поверхности, либо функционально, по способности инфильтрировать опухоли и обеспечивать лечение. TIL могут быть, как правило, разделены на категории на основании экспрессии одного или более из следующих биомаркеров: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 и CD25. Кроме того, как вариант, TIL могут быть функционально определены по способности инфильтрировать солидные опухоли при повторном введении пациенту. TIL могут быть дополнительно характеризоваться активностью - например, TIL могут считаться активными, если, например, высвобождение интерферона (ИФН) превышает приблизительно 50 пг/мл, превышает100 пг/мл, приблизительно 150 пг/мл или превышает 200 пг/мл. TILS могут считаться активными, если, например, высвобождение интерферона (ИФНγ) превышает приблизительно 50 пг/мл, превышает приблизительно 100 пг/мл, превышает приблизительно 150 пг/мл или превышает приблизительно 200 пг/мл, превышает приблизительно 300 пг/мл, превышает приблизительно 400 пг/мл, превышает приблизительно 500 пг/мл, превышает приблизительно 600 пг/мл, превышает приблизительно 700 пг/мл, превышает приблизительно 800 пг/мл, превышает приблизительно 900 пг/мл, превышает приблизительно 1000 пг/мл.

[00539] Термины «фармацевтически приемлемый носитель» или «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включают любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антимикотические агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, и инертные ингредиенты. Применение таких фармацевтически приемлемых носителей или фармацевтически приемлемых

вспомогательных веществ для активных фармацевтических ингредиентов хорошо известно в данной области техники. За исключением случаев, когда какой-либо фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество несовместимо с активным фармацевтическим ингредиентом, предусмотрено его использование в терапевтических композициях согласно настоящему изобретению. Дополнительные активные фармацевтические ингредиенты, такие как другие лекарственные средства, могут также быть включены в описанные композиции и способы.

[00540] Термины «приблизительно» и «примерно» означают «в пределах статистически значимого диапазона значения». Такой диапазон может быть в пределах одного порядка величины, предпочтительно в пределах 50%, более предпочтительно в пределах 20%, более предпочтительно в пределах 10% и даже более предпочтительно в пределах 5% определенного значения или диапазона. Допустимое отклонение, предусмотренное терминами «приблизительно» или «примерно», зависит от конкретной исследуемой системы, и может быть легко определено специалистом в данной области техники. Кроме того, в настоящем документе термины «приблизительно» и «примерно» означают, что измерения, размеры, составы, параметры, формы и другие величины и характеристики не являются точными и не обязательно должны быть точными, однако могут быть приблизительными и/или больше или меньше, по мере целесообразности, отражая допуски, факторы преобразования, округление, погрешность измерения и т.п., и другие факторы, известные специалистам в данной области техники. В общем случае измерение, размер, состав, параметр, форма или другая величина или характеристика являются «примерными» или «приблизительными», независимо от того, указано ли это явным образом или нет. Следует отметить, что описанные конструкции могут быть использованы во вариантах реализации с очень разными размерами, формами и измерениями.

[00541] Переходные термины «содержащий», «включающий», «состоящий по существу из» и «состоящий из» при использовании в прилагаемой формуле изобретения в исходной и измененной форме определяют объем изобретения в отношении того, какие из не указанных в пунктах формулы изобретения дополнительные элементы или этапы, если таковые имеются, исключены из объема формулы изобретения. Термины «содержащий» и «включающий» являются инклюзивными, или открытыми, и не исключают никаких дополнительных не перечисленных элементов, способов, этапов или материалов. Термин «состоящий из» исключает любые элементы, этапы или материалы, кроме указанных в формуле изобретения, и, в последнем случае, примеси, обычно ассоциированные с указанным материалом (материалами). Термин «состоящий по существу из» ограничивает объем формулы изобретения указанными элементами, этапами или материалом (материалами), а также теми, которые существенно не влияют на основную и новую характеристику (характеристики) заявленного изобретения. Все описанные здесь композиции, способы и наборы, представляющие собой варианты реализации настоящего

изобретения, в альтернативных вариантах реализации могут быть более конкретно определены любым из переходных терминов «содержащий», «включающий», «состоящий по существу из» и «состоящий из».

Процессы получения TIL (варианты осуществления процессов GEN3, необязательно включающие среды с определенным составом)

[00542] Без ограничения какой-либо конкретной теорией, считается, что подготовительное первое размножение, подготавливающее активацию Т-клеток, с последующим быстрым вторым размножением, которое стимулирует активацию Т-клеток согласно описанию способов по настоящему изобретению, позволяет получить размноженные Т-клетки, которые сохраняют фенотип «более молодых» клеток; и, соответственно, ожидается, что размноженные Т-клетки согласно настоящему изобретению будут демонстрировать более высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток по сравнению с Т-клетками, размноженными другими способами. В частности, считается, что активация Т-клеток, подготовленная воздействием антитела против CD3 (*например*, OKT-3), ИЛ-2 и необязательно антигенпрезентирующих клеток (АПК), а затем стимулированная последующим воздействием дополнительным антителом против CD-3 (*например*, OKT-3), ИЛ-2 и АПК согласно описанию способов по настоящему изобретению, ограничивает или позволяет избежать созревания Т-клеток в культуре, что дает популяцию Т-клеток с менее зрелым фенотипом, которые меньше истощает размножение в культуре и которые демонстрируют более высокую цитотоксичность в отношении раковых клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный этап быстрого второго размножения разделяют на множество этапов для вертикального масштабирования культуры посредством: (a) осуществления быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса Т-клеток из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнер G-REX 500MCS, и культивирование указанных Т-клеток из маломасштабной культуры в культуре большего масштаба в указанном втором контейнере на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (a) осуществления быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения Т-клеток из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть Т-клеток из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй

маломасштабной культуре на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) осуществления быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дней, и затем (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения Т-клеток из маломасштабной культуры по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторых контейнеров большего размера, чем первый контейнер, *например,* в контейнеры G-REX 500MCS, причем в каждом втором контейнере часть Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) осуществления быстрого второго размножения путем культивирования Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 4 дня, и затем (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения Т-клеток из маломасштабной культуры в 2, 3 или 4 вторых контейнера большего размера, чем первый контейнер, *например,* в контейнеры G-REX 500MCS, причем в каждом втором контейнере часть Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенную в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5 дней.

[00543] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило подготовительное первое размножение, начинает снижаться, затухать, падать или ослабевать.

[00544] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило подготовительное первое размножение, снизилась точно или приблизительно на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

[00545] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило подготовительное первое размножение, снизилась в процентном выражении точно или приблизительно на 1% - 100%.

[00546] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило

подготовительное первое размножение, снизилась в процентном выражении точно или приблизительно на 1% - 10%, 10% - 20%, 20% - 30%, 30% - 40%, 40% - 50%, 50% - 60%, 60% - 70%, 70% - 80%, 80% - 90% или 90% - 100%.

[00547] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило подготовительное первое размножение, снизилась по меньшей мере, точно или приблизительно, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

[00548] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение осуществляют после того как активация Т-клеток, которую обеспечило подготовительное первое размножение, снизилась, точно или приблизительно, на величину до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%.

[00549] Согласно некоторым вариантам реализации указанное снижение активации Т-клеток, осуществляемой путем подготовительного первого размножения, определяют по снижению количества интерферона-гамма, высвобождаемого Т-клетками в ответ на стимуляцию антигеном.

[00550] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 7 дней или приблизительно 8 дней.

[00551] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

[00552] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 1 день, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней.

[00553] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 11 дней.

[00554] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00555] Согласно некоторым вариантам реализации указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 1 день, 2

дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00556] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 7 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 11 дней.

[00557] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью до (точно или приблизительно) 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[00558] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 8 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 9 дней.

[00559] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 9 дней.

[00560] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 7 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью от (точно или приблизительно) 1 дня до (точно или приблизительно) 9 дней.

[00561] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней и указанное быстрое второе размножение Т-клеток осуществляют в течение периода продолжительностью 9 дней.

[00562] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

[00563] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (MIL).

[00564] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (ЛПК).

[00565] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки берут у

донора, страдающего раком.

[00566] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой TIL, которые берут из опухоли, вырезанной у пациента, страдающего раком.

[00567] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой MIL, взятые из костного мозга пациента, страдающего гематологическим злокачественным заболеванием.

[00568] Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки представляют собой ЛПК, взятые из мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК) от донора. Согласно некоторым вариантам реализации указанный донор страдает раком. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака эндометрия, рака щитовидной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе мультиформной глиобластомы (GBM)), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного донора присутствует опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой жидкую опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный донор страдает гематологическим злокачественным заболеванием.

[00569] Согласно определенным аспектам настоящего изобретения иммунные эффекторные клетки, *например,* Т-клетки, могут быть взяты из единицы крови, собранной у субъекта с применением любых методик, известных специалисту в данной области техники, таких как разделение в фиколле. Согласно одному предпочтительному аспекту клетки из кровотока индивидуума получают посредством афереза. Продукт афереза, как правило, содержит лимфоциты, в том числе Т-клетки, моноциты, гранулоциты, В-клетки, другие ядросодержащие лейкоциты, эритроциты и тромбоциты. Согласно одному аспекту клетки, собранные посредством афереза, могут быть промыты для удаления фракции плазмы и, необязательно, помещены клетки в подходящий буфер или среду для последующих этапов обработки. Согласно одному варианту реализации указанные клетки промывают забуференным фосфатом солевым раствором (ФСБ). Согласно

альтернативному варианту реализации раствор для промывания не содержит кальция и может не содержать магния; или может не содержать многих, либо вообще не содержать дивалентных катионов. Согласно одному аспекту, Т-клетки выделяют из лимфоцитов периферической крови путем лизиса эритроцитов и истощения по моноцитам, например, посредством центрифугирования в градиенте PERCOLL или проточного элютриационного центрифугирования.

[00570] Согласно некоторым вариантам реализации Т-клетки представляют собой ЛПК, выделенные из цельной крови или продукта афереза, обогащенных лимфоцитами от донора. Согласно некоторым вариантам реализации указанный донор страдает раком. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака эндометрия, рака щитовидной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе мультиформной глиобластомы (GBM)), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации у указанного донора присутствует опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой жидкую опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой солидную опухоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный донор страдает гематологическим злокачественным заболеванием. Согласно некоторым вариантам реализации ЛПК выделяют из цельной крови или продукта афереза, обогащенных лимфоцитами, с применением способов положительного или отрицательного отбора, *т.е.* извлечения ЛПК с использованием маркера (маркеров), *например,* CD3+ CD45+, фенотипа Т-клеток, или извлечения клеток, не имеющих фенотипа Т-клеток, с сохранением ЛПК. Согласно другим вариантам реализации ЛПК выделяют методом градиентного центрифугирования. После выделения ЛПК из ткани донора может быть инициировано подготовительное первое размножение ЛПК путем высевания подходящего количества выделенных ЛПК (согласно некоторым вариантам реализации приблизительно 1×10^7 ЛПК) в культуре для подготовительного первого размножения в соответствии с этапом подготовительного первого размножения любого из способов, описанных в настоящем документе.

[00571] Пример процесса с TIL, известный как процесс 3 (также называемого в настоящем документе GEN3), включающий некоторые из указанных признаков,

представлен на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), и некоторые преимущества указанного варианта реализации настоящего изобретения относительно процесса 2A описаны на фиг. 1, 2, 30 и 31 (в частности, *например*, на фиг. 1B и/или фиг. 1C). Два варианта реализации процесса 3 показаны на фиг. 1 и 30 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Процесс 2A или Gen 2 также описан в патентной публикации США №2018/.0280436, включенной в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00572] Как указано и в общих чертах описано в настоящем документе, TIL берут из образца от пациента и производят манипуляции для увеличения их количества перед трансплантацией пациенту с использованием процесса размножения TIL, описанного в настоящем документе и называемого Gen 3. Согласно некоторым вариантам реализации с указанными TIL могут быть необязательно проведены генетические манипуляции согласно обсуждению ниже. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL могут быть криоконсервированы до или после размножения. После размораживания они могут также быть рестимулированы для повышения метаболизма перед инфузией пациенту.

[00573] Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе процессы, называемые в настоящем документе «предваряющими быстрое размножение» («Pre-Rapid Expansion», пре-REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращают до 1-8 дней, а быстрое второе размножение (в том числе процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения («Rapid Expansion Protocol», REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращают до 1-9 дней, согласно подробному описанию ниже, а также в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе процессы, называемые в настоящем документе «предваряющими быстрое размножение» (пре-REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращают до 1-8 дней, а быстрое второе размножение (в том числе процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращают до 1-8 дней, согласно подробному описанию ниже, а также в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе процессы, называемые в настоящем документе «предваряющими быстрое размножение» (пре-REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B) сокращают до 1-7 дней, а быстрое второе размножение (в том числе процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) сокращают до 1-9 дней, согласно подробному описанию ниже, а также в примерах и на чертежах. Согласно

некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе процессы, называемые в настоящем документе «предваряющими быстрое размножение» (пре-REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап B), занимают 1-7 дней, а быстрое второе размножение (в том числе процессы, называемые в настоящем документе протоколом быстрого размножения (REP), а также процессы, представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) как этап D) занимают 1-10 дней, согласно подробному описанию ниже, а также в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) сокращают до 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7-9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8-9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) сокращают до 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) сокращают до 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7-10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение

согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 8-10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 9-10 дней. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) сокращают до 7 дней, а быстрое второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 7-9 дней. Согласно некоторым вариантам реализации комбинация подготовительного первого размножения и быстрого второго размножения (например, размножение, описанное для этапа B и этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) занимает 14-16 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на чертежах. В частности, считается, что некоторые варианты реализации настоящего изобретения включают этап подготовительного первого размножения, на котором TIL активируют воздействием антитела против CD3, *например*, OKT-3, в присутствии ИЛ-2, или воздействием антигена в присутствии по крайней мере ИЛ-2 и антитела против CD3, *например*, OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, которые активируют на этапе подготовительного первого размножения согласно описанию выше, представляют собой первую популяцию TIL, *т.е.* первичную популяцию клеток.

[00574] Обозначения «этапов» A, B, C и т.п. ниже относятся к неограничивающему примеру на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и определенным неограничивающим вариантам реализации, описанным в настоящем документе. Порядок описанных ниже и на фиг. 1 этапов (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) является иллюстративным примером любых комбинаций или порядка этапов; также настоящим изобретением и способами согласно описанию в настоящем документе предусмотрены дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов.

ЭТАП A: Взятие образца опухоли пациента

[00575] В общем случае TIL исходно берут из образца опухоли пациента («первичные TIL») или из циркулирующих лимфоцитов, таких как лимфоциты периферической крови, в том числе лимфоциты периферической крови, обладающие TIL-подобными характеристиками, а затем их размножают в более многочисленную популяцию для дальнейших манипуляций согласно описанию в настоящем документе, необязательно криоконсервируют и необязательно оценивают фенотип и метаболические параметры в качестве показателей здоровья TIL.

[00576] Образец опухоли пациента может быть получен с применением способов, известных в данной области техники, обычно с помощью хирургической резекции, игольной биопсии или других способов взятия образца, который содержит смесь опухолевых клеток и TIL. В общем случае образец опухоли может быть взят из любой

солидной опухоли, включая первичные опухоли, инвазивные опухоли или метастатические опухоли. Образец опухоли также может представлять собой жидкую опухолью, такую как опухоль, взятую из гематологического злокачественного новообразования. Солидная опухоль может относиться к любому типу рака, включая, но не ограничиваясь перечисленным, рак молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, толстой кишки, легких, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая, но не ограничиваясь перечисленным, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному и меланому). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака яичников, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы с тройным негативным фенотипом и немелкоклеточной карциномы легкого. Согласно некоторым вариантам реализации подходящие TIL взяты из опухолей злокачественной меланомы, поскольку по имеющимся сообщениям они, в частности, содержат высокие уровни TIL.

[00577] После взятия образца опухоли его обычно фрагментируют с использованием острой диссекции на мелкие кусочки размером от 1 до примерно 8 $мм^3$, в частности, подходят фрагменты размером 2-3 $мм^3$. TIL культивируют из указанных фрагментов, используя продукты ферментативного расщепления опухолей. Такие продукты расщепления опухоли могут быть получены путем инкубации в ферментативных средах (*например,* в буфере мемориального института Розуэлл Парк (RPMI) 1640, 2 мМ глутамат, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (*например,* с применением устройства для диссоциации тканей). Продукты расщепления опухоли могут быть получены путем помещения опухолей в ферментативные среды и механической диссоциации опухолей в течение приблизительно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, с последующим повторными циклами механической диссоциации и инкубации в вышеуказанных условиях, пока не останутся только небольшие кусочки ткани. В конце указанного процесса, если суспензия клеток содержит большое количество эритроцитов или мертвых клеток, для удаления указанных клеток может быть выполнено разделение в градиенте плотности с использованием разветвленного гидрофильного полисахарида FICOLL. Могут быть использованы альтернативные способы, известные в данной области техники, такие как описанные в опубликованной заявке на патент США № 2012/0244133 A1, содержание которой включено посредством ссылки в настоящий документ. Любые из вышеперечисленных способов могут быть использованы в любом из описанных в настоящем документе вариантов реализации способов размножения TIL или способов лечения рака.

[00578] Как указано выше, согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL происходят из солидных опухолей. Согласно некоторым вариантам реализации указанные солидные опухоли не фрагментируют. Согласно некоторым вариантам

реализации указанные солидные опухоли не фрагментируют и подвергают ферментативную расщеплению в виде цельных опухолей. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу, в течение 1-2 часов. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу в течение 1-2 часов при 37°C и 5% CO_2. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в смеси ферментов, содержащей коллагеназу, ДНКазу и гиалуронидазу в течение 1-2 часов при 37°C, 5% CO_2 и вращении. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в течение ночи при постоянном вращении. Согласно некоторым вариантам реализации опухоли расщепляют в течение ночи при 37°C, 5% CO_2 при постоянном вращении. Согласно некоторым вариантам реализации целую опухоль комбинируют с ферментами с получением реакционной смеси для расщепления опухоли.

[00579] Согласно некоторым вариантам реализации опухоль разводят с лиофилизированными ферментами в стерильном буфере. Согласно некоторым вариантам реализации указанный буфер представляет собой стерильный HBSS.

[00580] Согласно некоторым вариантам реализации указанная смесь ферментов содержит коллагеназу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная коллагеназа представляет собой коллагеназу IV. Согласно некоторым вариантам реализации рабочий раствор коллагеназы представляет собой 10X рабочий раствор 100 мг/мл.

[00581] Согласно некоторым вариантам реализации указанная смесь ферментов содержит ДНКазу. Согласно некоторым вариантам реализации рабочий раствор ДНКазы представляет собой 10X рабочий раствор 10000 МЕ/мл.

[00582] Согласно некоторым вариантам реализации указанная смесь ферментов содержит гиалуронидазу. Согласно некоторым вариантам реализации рабочий раствор гиалуронидазы представляет собой 10X рабочий раствор 10 мг/мл.

[00583] Согласно некоторым вариантам реализации указанная смесь ферментов содержит 10 мг/мл коллагеназы, 1000 МЕ/мл ДНКазы и 1 мг/мл гиалуронидазы.

[00584] Согласно некоторым вариантам реализации указанная смесь ферментов содержит 10 мг/мл коллагеназы, 500 МЕ/мл ДНКазы и 1 мг/мл гиалуронидазы.

[00585] Обычно суспензию клеток, полученную из опухоли, называют «первичной популяцией клеток», или «свежеполученной» или «свежевыделенной» популяцией клеток. Согласно некоторым вариантам реализации на указанную свежеполученную популяцию клеток TIL воздействуют клеточной культуральной средой, содержащей антигенпрезентирующие клетки, ИЛ-12 и OKT-3.

[00586] Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация включает физическую фрагментацию, включая, например, диссекцию, а также расщепление. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация представляет собой физическую фрагментацию. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация

представляет собой диссекцию. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментацию осуществляют путем расщепления. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть изначально культивированы из продуктов ферментативного расщепления опухолей и фрагментов опухолей, взятых от пациентов. Согласно варианту реализации TIL могут быть изначально культивированы из продуктов ферментативного расщепления опухолей и фрагментов опухолей, взятых от пациентов.

[00587] Согласно некоторым вариантам реализации, если указанная опухоль представляет собой солидную опухоль, опухоль подвергают физической фрагментации после взятия образца опухоли, например, на этапе A (как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит до криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит после криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит после взятия опухоли и без какой-либо криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации этап фрагментации представляет собой процесс in vitro или ex-vivo. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для подготовительного первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 30 или 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для подготовительного первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для подготовительного первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит от приблизительно 4 до приблизительно 50 фрагменты, причем каждый фрагмент имеет объем, составляющий приблизительно 27 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом, составляющим от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общим объемом, составляющим приблизительно 1350 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общей массой, составляющей от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 4 фрагмента.

[00588] Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL берут из фрагментов опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанный фрагмент опухоли получают путем острой диссекции. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 8 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 1 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер

фрагмента опухоли составляет приблизительно 2 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 3 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 4 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 5 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 6 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 7 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 8 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 9 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 10 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фрагменты опухоли имеют размеры 1-4 мм x 1-4 мм x 1-4 мм. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фрагменты опухоли имеют размеры 1 мм x 1 мм x 1 мм. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фрагменты опухоли имеют размеры 2 мм x 2 мм x 2 мм. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фрагменты опухоли имеют размеры 3 мм x 3 мм x 3 мм. Согласно некоторым вариантам реализации указанные фрагменты опухоли имеют размеры 4 мм x 4 мм x 4 мм.

[00589] Согласно некоторым вариантам реализации указанные опухоли фрагментируют для минимизации количества геморрагической, некротической и/или жировой ткани на каждом участке. Согласно некоторым вариантам реализации указанные опухоли фрагментируют для минимизации количества геморрагической ткани на каждом участке. Согласно некоторым вариантам реализации указанные опухоли фрагментируют для минимизации количества некротической ткани на каждом участке. Согласно некоторым вариантам реализации указанные опухоли фрагментируют для минимизации количества жировой ткани на каждом участке. Согласно некоторым вариантам реализации этап фрагментации опухоли представляет собой in vitro или ex-vivo способ.

[00590] Согласно некоторым вариантам реализации указанную фрагментацию опухоли осуществляют так, чтобы сохранить внутреннюю структуру опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации указанную фрагментацию опухоли осуществляют без предварительного распиливающего движения скальпелем. Согласно некоторым вариантам реализации TIL берут из продуктов расщепления опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли получали путем инкубации в ферментативной среде, например, но не ограничиваясь перечисленным RPMI 1640, 2 мМ GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 Ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). После помещения в ферментативную среду опухоль может быть механически диссоциирована в течение 1 минуты. Затем раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, после чего его повторно механически расщепляют в течение приблизительно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, указанная опухоль может быть механически расщеплена в третий раз в

течение приблизительно 1 минуты. Согласно некоторым вариантам реализации после третьего механического разрушения, при наличии больших фрагментов ткани образец 1 или 2 раза дополнительно подвергают механической диссоциации, с дополнительной 30-минутной инкубацией или без инкубации при 37°C в 5% CO_2. Согласно некоторым вариантам реализации в конце последней инкубации, если суспензия клеток содержит значительное число эритроцитов или мертвых клеток, для удаления указанных клеток может быть проведено разделение в градиенте плотности с применением Ficoll.

[00591] Согласно некоторым вариантам реализации суспензию клеток до этапа подготовительного первого размножения называют «первичной популяцией клеток» или «свежеполученной» или «свежевыделенной» популяцией клеток.

[00592] Согласно некоторым вариантам реализации клетки могут быть необязательно заморожены после взятия образца (*например,* после взятия образца опухоли и/или после взятия суспензии клеток из образца опухоли) и заморожены для хранения перед переходом к размножению, описанному для этапа B, который подробнее ниже, а также представлен в примере на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

1. Полученные с применением трепанобиопсии/малой биопсии TILS

[00593] Согласно некоторым вариантам реализации TIL исходно берут из образца опухоли пациента («первичные TIL»), взятого с помощью трепанобиопсии или аналогичной процедуры, и затем размножают в популяцию большего размера для дальнейших манипуляций, описанных в настоящем документе, необязательно криоконсервируют, необязательно оценивают фенотип и метаболические показатели.

[00594] Согласно некоторым вариантам реализации образец опухоли пациента может быть взят с применением способов, известных в данной области техники, как правило, посредством малой биопсии, трепанобиопсии, игольной биопсии или других способов взятия образца, который содержит смесь опухолевых клеток и TIL. В общем случае образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, в том числе из первичных опухолей, инвазивных опухолей или метастатических опухолей. Указанный образец опухоли могут также представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, взятая из злокачественного гематологического образования. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец может происходить из нескольких небольших образцов опухоли или биоптатов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец может содержать несколько образцов опухоли из одной опухоли от одного и того же пациента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец может содержать несколько образцов опухолей из одной, двух, трех или четырех опухолей от одного и того же пациента. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец может содержать несколько образцов опухолей из нескольких опухолей от одного и того же пациента. Солидная опухоль может относиться к любому типу рака, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, рака молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, толстой кишки, легких, головного мозга, почек, желудка и кожи (включая, помимо прочего, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную

карциному и меланому). Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака яичников, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы с тройным негативным фенотипом и немелкоклеточной карциномы легкого (НМРЛ). Согласно некоторым вариантам реализации подходящие TIL берут из опухолей злокачественной меланомы, поскольку по имеющимся сообщениям они, в частности, содержат высокие уровни TIL.

[00595] В общем случае суспензия клеток, взятая из трепанобиоптата или фрагмента опухоли, называется «популяцией первичных клеток», или популяцией «свежесобранных» или «свежевыделенных» клеток. Согласно некоторым вариантам реализации на популяцию свежесобранных клеток TIL воздействуют клеточной культуральной средой, содержащей антигенпрезентирующие клетки, ИЛ-2 и ОКТ-3.

[00596] Согласно некоторым вариантам реализации, если опухоль является метастатической и в прошлом было проведено эффективное лечение/удаление первичного очага, может требоваться извлечение одного из метастатических очагов. Согласно некоторым вариантам реализации наименее инвазивный подход заключается в извлечении кожного очага или лимфатического узла на шее или из подмышечной области, если это возможно. Согласно некоторым вариантам реализации извлекают кожный очаг или проводят малую биопсию кожного очага. Согласно некоторым вариантам реализации извлекают лимфатический узел или проводят малую биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации может быть использован метастатический очаг в легком или печени, внутрибрюшинный или грудной лимфатический узел, или продукт их малой биопсии.

[00597] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой меланому. Согласно некоторым вариантам реализации указанный продукт малой биопсии для определения меланомы содержит невус или его часть.

[00598] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой панч-биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации панч-биопсию проводят путем вдавливания в кожу круглого лезвия. Согласно некоторым вариантам реализации панч-биопсию проводят путем вдавливания в кожу круглого лезвия вокруг подозрительного невуса. Согласно некоторым вариантам проводят панч-биопсию путем вдавливания в кожу круглого лезвия и извлекают извлекают круглый кусочек кожи. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой панч-биопсию и извлекают круглый фрагмент опухоли.

[00599] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, и невус или образование извлекают полностью. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, и невус или образование

извлекают полностью вместе с небольшой полосой визуально нормальной кожи.

[00600] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию и извлекают только наиболее иррегулярную часть невуса или образования. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию, и указанная инцизионная биопсия используется, когда не могут быть использованы другие способы, например, если подозрительный невус имеет очень большой размер.

[00601] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой биопсию легкого. Согласно некоторым вариантам реализации указанную малую биопсию проводят путем бронхоскопии. Обычно при бронхоскопии пациенту проводят анестезию, и небольшой инструмент заводят через нос или рот, вниз по глотке в бронхиальные проходы, откуда с помощью небольших инструментов извлекают часть ткани. Согласно некоторым вариантам реализации, если опухоль или образование недоступны для бронхоскопии, может быть использована трансторакальная игольная биопсия. Обычно при трансторакальной игольной биопсии пациент также находится под анестезией, и иглу вводят через кожу непосредственно в подозрительный участок для извлечения небольшого образца ткани. Согласно некоторым вариантам реализации при проведении трансторакальной игольной биопсии может требоваться рентгенохирургическое вмешательство (например, применение рентгеновского излучения или КТ-сканирования для направления иглы). Согласно некоторым вариантам реализации малую биопсию проводят путем игольной биопсии. Согласно некоторым вариантам реализации малую биопсию проводят с помощью ультразвуковой эндоскопии (например, эндоскоп с подсветкой вводят через рот в пищевод). Согласно некоторым вариантам реализации малую биопсию проводят хирургическим путем.

[00602] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой биопсию головы и шеи. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию. Согласно некоторым вариантам указанная малая биопсия представляет собой инцизионную биопсию, отличающуюся тем, что небольшой кусочек ткани вырезают из аномально выглядящего участка. Согласно некоторым вариантам реализации, если аномальная область легкодоступна, образец может быть взят без госпитализации. Согласно некоторым вариантам реализации, если опухоль располагается глубже в ротовой полости или горле, может потребоваться проведение биопсии в операционной палате под общей анестезией. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой эксцизионную биопсию, отличающуюся тем, что область извлекают полностью. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой тонкоигольную аспирацию (FNA). Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой

тонкоигольную аспирацию (FNA), отличающуюся тем, что для экстракции (аспирации) клеток из опухоли или уплотнения используется очень тонкая игла, прикрепленная к шприцу. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой панч-биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой панч-биопсию, отличающуюся тем, что для извлечения кусочка из подозрительной области используют щипцы для панч-биопсии.

[00603] Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой биопсию шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанную малую биопсию проводят путем кольпоскопии. Обычно в способах кольпоскопии используют увеличительный прибор с подсветкой, присоединенный к увеличительному бинокуляру (кольпоскопу), который, соответственно, используют для биопсии небольшого участка поверхности шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой конизацию/конусовидную биопсию. Согласно некоторым вариантам реализации указанная малая биопсия представляет собой конизацию/конусовидную биопсию, при которой может потребоваться амбулаторная операция для извлечения более крупного участка ткани из шейки матки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная конусовидная биопсия может служить не только для дополнительного подтверждения диагноза, но и в качестве начального лечения.

[00604] Термин «солидная опухоль» относится к аномальному тканевому образованию, которое обычно не включает кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «рак с солидными опухолями» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Рак в виде солидной опухоли включает, не ограничиваясь перечисленными, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, рак молочной железы, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом, рак предстательной железы, ободочной кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи, глиобластома, рака яичников, саркомы, рака поджелудочной железы, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака молочной железы с тройным негативным фенотипом, и немелкоклеточной карциномы легкого. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включающие паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых рассредоточены раковые клетки и которые могут обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[00605] Согласно некоторым вариантам реализации образец из опухоли получают в виде продукта тонкоигольной аспирации (FNA), трепанобиоптата, продукта малой биопсии (включая, например, панч-биопсию). Согласно некоторым вариантам реализации образец сначала помещают в G-Rex 10. Согласно некоторым вариантам реализации образец сначала помещают в G-Rex 10, если имеются 1 или 2 образца биопсии и/или небольшие образцы биопсии. Согласно некоторым вариантам реализации образец

помещают сначала в G-Rex 100, если имеется 3, 4, 5, 6, 8, 9 или 10 или более образцов трепанобиопсии и/или малой биопсии. Согласно некоторым вариантам реализации образец помещают сначала в G-Rex 500, если имеется 3, 4, 5, 6, 8, 9 или 10 или более образцов трепанобиопсии и/или малой биопсии

[00606] Биоптат FNA может быть взят из опухоли, выбранной из группы, состоящей из опухоли легкого, меланомы, опухоли головы и шеи, шейки матки, яичников, поджелудочной железы, глиобластомы, опухоли толстой и прямой кишки и саркомы. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоптат FNA берут из опухоли легкого, такой как опухоль легкого от пациента с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). В некоторых случаях у пациента с НМРЛ ранее проводилось хирургическое лечение.

[00607] TIL, описанные в настоящем документе, могут быть взяты из образца FNA. В некоторых случаях образец FNA получают или выделяют из организма пациента с использованием иглы тонкого калибра в диапазоне от 18 до 25 калибра. Игла тонкого калибра может иметь 18 калибр, 19 калибр, 20 калибр, 21 калибр, 22 калибр, 23 калибр, 24 калибр или 25 калибр. Согласно некоторым вариантам реализации образец FNA от пациента может содержать по меньшей мере 400000 TIL, *например,* 400000 TIL, 450000 TIL, 500000 TIL, 550000 TIL, 600000 TIL, 650000 TIL, 700000 TIL, 750000 TIL, 800000 TIL, 850000 TIL, 900000 TIL, 950000 TIL или более.

[00608] В некоторых случаях TIL, описанные в настоящем документе, берут из образца трепанобиопсии. В некоторых случаях указанный образец трепанобиопсии получают или выделяют из организма пациента с применением хирургических или медицинских игл в диапазоне от 11 калибра до 16 калибра Игла может иметь 11 калибр, 12 калибр, 13 калибр, 14 калибр, 15 калибр или 16 калибр. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец трепанобиопсии от пациента может содержать по меньшей мере 400000 TIL, *например,* 400000 TIL, 450000 TIL, 500000 TIL, 550000 TIL, 600000 TIL, 650000 TIL, 700000 TIL, 750000 TIL, 800000 TIL, 850000 TIL, 900000 TIL, 950000 TIL или более.

[00609] В общем случае собранную суспензию клеток называют «популяцией первичных клеток» или популяцией «свежесобранных» клеток.

[00610] Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL взяты не из продуктов расщепления опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации биоптаты солидных опухолей не фрагментированы.

[00611] Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL взяты из продуктов расщепления опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли получали путем инкубации в ферментативной среде, например, но не ограничиваясь перечисленным RPMI 1640, 2 мМ GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицин, 30 Ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующим механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). После помещения опухоли в ферментативную среду указанная опухоль может быть механически диссоциирована в

течение приблизительно 1 минуты. Затем раствор может быть инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, после чего его повторно механически расщепляют в течение приблизительно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2 опухоль может быть механически измельчена в третий раз в течение приблизительно 1 минуты. Согласно некоторым вариантам реализации после третьего механического разрушения, при наличии больших фрагментов ткани образец 1 или 2 раза дополнительно подвергают механической диссоциации, с дополнительной 30-минутной инкубацией или без инкубации при 37°C в 5% CO_2. Согласно некоторым вариантам реализации в конце последней инкубации, если суспензия клеток содержала значительное число эритроцитов или мертвых клеток, для удаления указанных клеток может быть выполнено разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll.

[00612]

2. Способы размножения лимфоцитов периферической крови (ЛПК) из периферической крови

[00613] Способ 1 для ЛПК. Согласно варианту реализации настоящего изобретения ЛПК размножают с применением процессов, описанных в настоящем документе. Согласно варианту реализации настоящего изобретения указанный способ включает взятие образца МКПК из цельной крови. Согласно варианту реализации указанный способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из МКПК с применением отрицательного отбора по фракции без CD19+. Согласно варианту реализации указанный способ включает обогащение Т-клеток путем выделения чистых Т-клеток из МКПК с применением отрицательного отбора на основе магнитных гранул по фракции без CD19+.

[00614] Согласно варианту реализации настоящего изобретения Способ 1 для ЛПК реализуют следующим образом: на 0 день криоконсервированный образец МКПК размораживают и МКПК подсчитывают. Т-клетки выделяют с применением набора для выделения Т-клеток человека (Human Pan T-Cell Isolation Kit) и LS-колонок (Miltenyi Biotec).

[00615] Способ 2 для ЛПК. Согласно варианту реализации настоящего изобретения ЛПК размножают с применением Способа 2 для ЛПК, который включает взятие образца МКПК из цельной крови. Т-клетки из МКПК обогащают путем инкубирования указанных МКПК в течение по меньшей мере трех часов при 37°C с последующим выделением неадгезивных клеток.

[00616] Согласно варианту реализации настоящего изобретения ЛПК Способ 2 реализуют следующим образом: На 0 день криоконсервированный образец МКПК размораживают и клетки МКПК высевают с плотностью 6 млн клеток на лунку в 6-луночный планшет в среду СМ-2 и инкубируют в течение 3 часов при 37°C. Через 3 часа неадгезивные клетки, представляющие собой ЛПК, извлекают и подсчитывают.

[00617] Способ 3 для ЛПК. Согласно варианту реализации настоящего изобретения ЛПК размножают с применением Способа 3 для ЛПК, который включает взятие образца

МКПК из периферической крови. В-клетки выделяют, используя отбор по CD19+, и Т-клетки отбирают с применением отрицательного отбора по фракции без CD19+ из образца МКПК.

[00618] Согласно варианту реализации настоящего изобретения ЛПК Способ 3 осуществляют следующим образом: На 0 день криоконсервированные МКПК, происходящие из периферической крови размораживают и подсчитывают. CD19+ В-клетки сортируют с применением набора CD19 Multisort Kit, Human (Miltenyi Biotec). От фракции не-CD19+ клеток Т-клетки очищают с применением набора Human Pan T-cell Isolation Kit и LS колонок (Miltenyi Biotec).

[00619] Согласно варианту реализации МКПК выделяют из образца цельной крови. Согласно варианту реализации указанный образец МКПК применяют в качестве исходного материала для размножения ЛПК. Согласно варианту реализации указанный образец криоконсервируют перед процессом размножения. Согласно другому варианту реализации свежий образец применяют в качестве исходного материала для размножения ЛПК. Согласно варианту реализации настоящего изобретения Т-клетки выделяют из МКПК с применением способов, известных в данной области техники. Согласно варианту реализации Т-клетки выделяют с применением набора Human Pan T-cell Isolation Kit и LS колонок. Согласно варианту реализации настоящего изобретения Т-клетки выделяют из МКПК с применением способов отбора с антителами, известных в данной области техники, например, отрицательного отбора по CD19.

[00620] Согласно варианту реализации настоящего изобретения образец МКПК инкубируют на протяжении периода времени и при температуре, эффективных для идентификации неадгезивных клеток. Согласно варианту реализации настоящего изобретения время инкубации составляет приблизительно 3 часа. Согласно варианту реализации настоящего изобретения температура составляет приблизительно 37° по Цельсию. Затем неадгезивные клетки размножают с применением процесса, описанного выше.

[00621] Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец МКПК взят от субъекта или пациента, который необязательно предварительно получал лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец опухоли взят от субъекта или пациента, который предварительно получал лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец МКПК взят от субъекта или пациента, получавшего предварительное лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK, получавшего лечение в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев или 1 года или более. Согласно другому варианту реализации указанные МКПК происходят из организма пациента, в текущий период получающего лечение по схеме с ингибитором ITK, таким как ибрутиниб.

[00622] Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец МКПК взят от субъекта или пациента, получавшего предварительное лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK и рефрактерен к лечению ингибитором киназы или ингибитором ITK, таким как ибрутиниб.

[00623] Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец МКПК взят от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK, но уже не проходит лечение ингибитором киназы или ингибитором ITK. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец МКПК взят от субъекта или пациента, который получал предварительное лечение по схеме, включающей ингибитор киназы или ингибитор ITK, но уже не проходит лечение ингибитором киназы или ингибитором ITK, и не проходил лечение в течение по меньшей мере 1 месяца, по меньшей мере 2 месяцев, по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 4 месяцев, по меньшей мере 5 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев или по меньшей мере 1 года, или дольше. Согласно другому варианту реализации указанные МКПК происходят из организма пациента, получавшего ингибитор ITK ранее, однако не получавшего лечения на протяжении по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 9 месяцев или по меньшей мере 1 года.

[00624] Согласно варианту реализации настоящего изобретения на 0 день клетки отбирают по CD19+ и соответствующим образом сортируют. Согласно варианту реализации настоящего изобретения отбор осуществляют с применением связывающих антитела гранул. Согласно варианту реализации настоящего изобретения чистые Т-клетки выделяют из МКПК на 0 день.

[00625] Согласно варианту реализации настоящего изобретения в случае пациентов, не получавших предварительного лечения ибрутинибом или другим ингибитором ITK, 10-15 мл лейкотромбоцитарного слоя дают приблизительно 5×10^9 МКПК, которые, в свою очередь, дают приблизительно $5,5\times10^7$ ЛПК.

[00626] Согласно варианту реализации настоящего изобретения в случае пациентов, получавших предварительное лечение ибрутинибом или другим ингибитором ITK, процесс размножения дает приблизительно 20×10^9 ЛПК. Согласно варианту реализации настоящего изобретения $40,3\times10^6$ МКПК дают приблизительно $4,7\times10^5$ ЛПК.

[00627] Согласно любому из вышеперечисленных вариантов реализации МКПК могут быть получены из образца цельной крови, аферезом, из лейкотромбоцитарного слоя или любым другим способом получения МКПК, известных в данной области техники.

3. Способы размножения инфильтрирующих костный мозг лимфоцитов (MIL) из происходящих из костного мозга МКПК

[00628] Способ 3 для MIL. Согласно варианту реализации настоящего изобретения указанный способ включает взятие МКПК из костного мозга. На 0 день МКПК отбирают по CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ и сортируют, фракцию не-CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ клеток обрабатывают ультразвуком и часть указанной обработанной ультразвуком фракции клеток добавляют обратно в отобранную фракцию клеток.

[00629] Согласно варианту реализации настоящего изобретения Способ 3 для MIL реализуют следующим образом: На 0 день криоконсервированный образец МКПК размораживают и подсчитывают МКПК. Клетки окрашивают антителами к CD3, CD33, CD20 и CD14 антител и сортируют с применением сортера клеток S3e (Bio-Rad). Клетки разделяют на две фракции - фракцию иммунных клеток (или фракцию MIL) (CD3+CD33+CD20+CD14+) и фракцию бластных клеток AML (не-CD3+CD33+CD20+CD14+).

[00630] Согласно варианту реализации настоящего изобретения МКПК берут из костного мозга. Согласно варианту реализации МКПК берут из костного мозга посредством афереза, аспирации, игольной биопсии или других аналогичных способов, известных в данной области техники. Согласно варианту реализации указанные МКПК представляют собой свежие МКПК. Согласно другому варианту реализации указанные МКПК представляют собой криоконсервированные МКПК.

[00631] Согласно варианту реализации настоящего изобретения MIL размножают из 10-50 мл аспирата костного мозга. Согласно варианту реализации настоящего изобретения у указанного пациента берут 10 мл аспирата костного мозга. Согласно другому варианту реализации у указанного пациента берут 20 мл аспирата костного мозга. Согласно другому варианту реализации у указанного пациента берут 30 мл аспирата костного мозга. Согласно другому варианту реализации у указанного пациента берут 40 мл аспирата костного мозга. Согласно другому варианту реализации у указанного пациента берут 50 мл аспирата костного мозга.

[00632] Согласно варианту реализации настоящего изобретения количество МКПК, которое получают из приблизительно 10-50 мл аспирата костного мозга, составляет от приблизительно 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 МКПК. Согласно другому варианту реализации полученное количество МКПК составляет приблизительно 7×10^7 МКПК.

[00633] Согласно варианту реализации настоящего изобретения из количества МКПК от приблизительно 5×10^7 до приблизительно 10×10^7 получают от приблизительно $0{,}5\times10^6$ до приблизительно $1{,}5\times10^6$ MIL. Согласно варианту реализации настоящего изобретения получают приблизительно 1×10^6 MIL.

[00634] Согласно варианту реализации настоящего изобретения из 12×10^6 МКПК, происходящих из аспирата костного мозга, получают приблизительно $1{,}4\times10^5$ MIL.

[00635] Согласно любому из вышеперечисленных вариантов реализации МКПК могут происходить из образца цельной крови, из костного мозга, могут быть получены путем афереза, из лейкотромбоцитарного слоя или любым другим способом получения МКПК, известным в данной области техники.

ЭТАП B: Подготовительное первое размножение

[00636] Согласно некоторым вариантам реализации предложенные способы обеспечивают более получение более молодых TIL, которые могут обеспечивать дополнительные благоприятные терапевтические эффекты по сравнению с более старыми TIL (*m.e.* TIL, которые уже прошли больше циклов репликации перед введением

субъекту/пациенту). Характеристики молодых TIL были описаны в опубликованных источниках, например Donia, at al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012); Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., J Immunother, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., Clin Cancer Res, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009); Robbins, et al., J Immunol 2004; 173:7125-7130; Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); и Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008), каждый из которых включен в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00637] После диссекции или расщепления фрагментов опухоли, например, согласно описанию этапа A на фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C), полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и фидерные клетки (например, антигенпрезентирующие фидерные клетки), в условиях, способствующих преимущественно росту TIL, а не опухолевых и других клеток. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, OKT-3 и фидерные клетки добавляют в начале культивирования наряду с продуктами расщепления опухоли и/или фрагментами опухоли (*например,* на 0 день). Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли и/или фрагменты опухоли инкубируют в контейнере, используя до 60 фрагментов на контейнер, с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего несколько дней, как правило, от 1 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего несколько дней, как правило, от 1 до 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего от 1 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего от 1 до 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего от 5 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего от 5 до 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего приблизительно от 6 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8

смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего приблизительно от 6 до 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего приблизительно от 7 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего приблизительно 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение происходит на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL.

[00638] Согласно предпочтительному варианту реализации размножение TIL может быть проведено с использованием этапа подготовительного первого размножения (например, такого как описанное для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), который может включать процессы, называемые пре-REP, или подготовительное REP, и который включает фидерные клетки с 0 дня и/или с инициации культивирования) согласно описанию здесь и далее, с последующим быстрым вторым размножением (этап D, в том числе процессы, называемые этапами протокола быстрого размножения (REP)) согласно приведенному ниже описанию этапа D и в тексте настоящего документа, с последующей необязательной криоконсервацией, и с последующим вторым этапом D (включая процессы, называемые этапами рестимуляции при REP) согласно описанию здесь и далее. TIL, полученные в результате указанного процесса, могут быть необязательно охарактеризованы для определения фенотипических характеристик и метаболических показателей согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$.

[00639] Согласно некоторым вариантам реализации культуральную среду для первого размножения сокращенно называют «CM», от «culture media», т.е. «культуральная среда». В некоторых вариантах реализации CM для стадии B состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, дополненной 10% сывороткой AB человека, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина.

[00640] Согласно некоторым вариантам реализации количество фрагментов опухоли составляет 240 или менее. Согласно некоторым вариантам реализации количество фрагментов опухоли составляет 240 или менее, и их размещают в 4 или менее контейнерах. Согласно некоторым вариантам реализации указанные контейнеры представляют собой флаконы GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации 60 фрагментов опухоли или менее помещают в 1 контейнер. Согласно некоторым

вариантам реализации каждый контейнер содержит 500 мл среды на контейнер или менее. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки (также называемые в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками»). Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 30 нг/мл OKT-3 на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой флакон GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00641] После приготовления фрагментов опухоли полученные клетки (*т.е.* фрагменты, который представляют собой популяцию первичных клеток) культивируют в среде, содержащей ИЛ-2, антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3, в условиях, способствующих преимущественно росту TIL, а не опухолевых и других клеток, и обеспечивающих подготовку и усиленный рост TIL после инициации культуры на 0 день. Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли и/или фрагменты опухоли инкубируют с 6000 МЕ/мл ИЛ-2, а также антигенпрезентирующими фидерными клетками и OKT-3. Указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего несколько дней, как правило, от 1 до 8 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации ростовая среда при подготовительном первом размножении содержит ИЛ-2 или его вариант, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего несколько дней, как правило, от 1 до 7 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации ростовая среда при подготовительном первом размножении содержит ИЛ-2 или его вариант, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки и OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ИЛ-2 представляет собой рекомбинантный ИЛ-2 человека (рчИЛ-2). Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью $20\text{-}30 \times 10^6$ МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 20×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 25×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 30×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый

раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 4-8×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 5-7×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанный стоковый раствор ИЛ-2 готовят согласно описанию в примере С. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 10000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 9000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 7000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2 или приблизительно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 9000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 7000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00642] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 160 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 140 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 120 МЕ/мл ИЛ-15 или

приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения дополнительно содержит ИЛ-15. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15.

[00643] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 4 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 3 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит от приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит

ИЛ-21. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21.

[00644] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит антитело OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 30 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 15 нг/мл до 30 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит 30 нг/мл антитела OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело OKT-3 представляет собой муромонаб.

ТАБЛИЦА 3: Последовательности аминокислот муромонаба (пример антитела OKT-3)

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:1 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360

	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

[00645] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения содержит один или более агонистов TNFRSF в клеточной культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF включает агонист 4-1BB. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и указанный агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в клеточной культуральной среде от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в клеточной культуральной среде от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00646] Согласно некоторым вариантам реализации наряду с одним или более агонистов TNFRSF клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения дополнительно содержит ИЛ-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом указанный один или более агонистов TNFRSF включает агонист 4-1BB. Согласно некоторым вариантам реализации наряду с одним или более агонистов TNFRSF клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения дополнительно содержит ИЛ-2 в начальной концентрации приблизительно 6000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом указанный один или более агонистов TNFRSF включает агонист 4-1BB.

[00647] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения сокращенно называется «CM», от «culture media» - «культуральная среда». Согласно некоторым вариантам реализации ее называют CM1 (культуральная среда 1). В некоторых вариантах реализации CM состоит RPMI 1640 с GlutaMAX, с добавлением 10% сыворотки AB человека, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. Согласно некоторым вариантам реализации указанная CM представляет

собой CM1, описанную в примерам, см. пример A. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение происходит в исходной клеточной культуральной среде или в первой клеточной культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для подготовительного первого размножения, или исходная клеточная культуральная среда, или первая клеточная культуральная среда содержит ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (также называемые в настоящем документе фидерными клетками).

[00648] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в процессах размножения согласно описанию в настоящем документе, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации бессывороточную среду или среду с определенным составом применяют для предотвращения и/или уменьшения экспериментальной изменчивости, частично обусловленной изменчивостью содержащих сыворотку сред от партии к партии.

[00649] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими: CTS™ OpTmizer™ Базальная среда для увеличения Т-клеток, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальная необходимая среда (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательная среда RPMI и модифицированная среда Дульбекко Искова.

[00650] Согласно некоторым вариантам реализации сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки CTS™ OpTmizer заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, один или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более антибиотиков, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+},

Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00651] Согласно некоторым вариантам реализации заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement применяют со стандартными ростовыми средами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, базальной средой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточной средой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, средой CTS™ AIM-V, CST™ AIM-V SFM, средой для размножения Т-клеток без ксеногенных компонентов LymphoONE™, средой Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной средой (MEM), базальной средой Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной средой (αMEM), минимальной питательной средой Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и модифицированной Исковым средой Дульбекко.

[00652] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки (% об.) в указанной бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[00653] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом представлена средой CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific). Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных

клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00654] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000

МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00655] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00656] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00657] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в международной PCT-публикации WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для применения согласно

настоящему изобретению. В указанной публикации описана бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток. Указанная бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток включает базальную клеточную культуральную среду с добавлением бессывороточной добавки, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной культуральной среды для эукариотических клеток содержит один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более следовых элементов, и одного или более антибиотиков; или указанную добавку получают путем комбинации перечисленных ингредиентов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин или заменитель альбумина и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), ростовой среды RPMI и модифицированной Исковым среды Дульбекко.

[00658] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация глицина в среде с определенным составом варьирует в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-гистидина составляет приблизительно 5-250 мг/л, концентрация L-изолейцина составляет приблизительно 5-300 мг/л, концентрация L-метионина составляет приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-фенилаланина составляет приблизительно 5-400 мг/л, концентрация L-пролина составляет приблизительно 1-1000 мг/л, концентрация L- гидроксипролина составляет приблизительно 1-45 мг/л, концентрация L-серина составляет приблизительно 1-250 мг/л, концентрация L-треонина составляет

приблизительно 10-500 мг/л, концентрация L-триптофана составляет приблизительно 2-110 мг/л, концентрация L-тирозина составляет приблизительно 3-175 мг/л, концентрация L-валина составляет приблизительно 5-500 мг/л, концентрация тиамина составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация восстановленного глутатиона составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация L-аскорбиновая кислота-2-фосфата составляет приблизительно 1-200 мг/л, концентрация насыщенного железом трансферрина составляет приблизительно 1-50 мг/л, концентрация инсулина составляет приблизительно 1-100 мг/л, концентрация селенита натрия составляет приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л и концентрация альбумина (например, AlbuMAX® I) составляет приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[00659] Согласно некоторым вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в IX среде» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в конечных концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации IX среды» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанная бессывороточная добавка содержит не содержащие следовых элементов ингредиенты, типы и концентрации которых указаны в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации добавки» в таблице A ниже.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, не содержащих следовых элементов

Ингредиент	Предпочтительный вариант реализации добавки (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в IX среде (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант реализации в IX среде (мг/л) (Приблизительно)
Глицин	150	5-200	53
L-Гистидин	940	5-250	183
L-Изолейцин	3400	5-300	615
L-Метионин	90	5-200	44
L-Фенилаланин	1800	5-400	336
L-Пролин	4000	1-1000	600
L-Гидроксипролин	100	1-45	15
L-Серин	800	1-250	162
L-Треонин	2200	10-500	425
L-Триптофан	440	2-110	82

L-Тирозин	77	3-175	84
L-Валин	2400	5-500	454
Тиамин	33	1-20	9
Восстановленный глутатион	10	1-20	1,5
Аскорбиновая кислота-2-PO_4 (соль Mg)	330	1-200	50
Трансферрин (насыщенный железом)	55	1-50	8
Инсулин	100	1-100	10
Натрия селенит	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83 000	5000-50 000	12 500

[00660] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации в среду с определенным составом добавляют до приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия. В среду с определенным составом может быть дополнительно добавлен L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ), 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[00661] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в источнике: Smith, et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) подходят для применения согласно настоящему изобретению. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды, и добавляли 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[00662] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известный как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

[00663] Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B

на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 1 до 8 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 2 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 3 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которое может включать процессы, иногда называемые пре-REP или подготовительным REP) занимает от 4 до 8 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 1 до 7 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 2 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 2 до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 3 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 3 до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 4 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам

реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 4 до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 5 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 5 до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 6 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 6 до 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает от 7 до 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации процесс подготовительного первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), которые могут включать процессы, иногда называемые «пре-REP» или подготовительным REP) занимает 7 дней.

[00664] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым

вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 3- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 3- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 4- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 4- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 5- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 5- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 6- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 6- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 7-8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения.

[00665] Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение TIL может продолжаться в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 3- 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 3- 7 дней.

Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 4- 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 5-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 5-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 6-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 6-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 7-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 7 дней.

[00666] Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21 используют в качестве комбинации при подготовительном первом размножении. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены при подготовительном первом размножении, в том числе, например, в процессы этапа B в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также с описанием в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 используют в качестве комбинации при подготовительном первом размножении. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-15, и ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены в процессы этапа B в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и описанием в настоящем документе.

[00667] Согласно некоторым вариантам реализации указанное подготовительное первое размножение, например, этап B в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации биореактор используют в качестве контейнера. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-10.

1. Фидерные клетки и антигенпрезентирующие клетки

[00668] Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками»)

при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 4-8 дни. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 4-7 дни. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 5-8 дни. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 5-7 дни. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 6-8 дни. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 6-7 дни.

Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 7 или 8 день. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 7 день. Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), не требуют наличия фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL, но их добавляют при подготовительном первом размножении в любое время на 8 день.

[00669] Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе (например, включающие размножение согласно описанию этапа B на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также называемые пре-REP, или подготовительным REP), требуют наличия фидерных клеток (также называемые в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками») при инициации размножения TIL TIL и при подготовительном первом размножении. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), взятые из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. МКПК получают с применением стандартных способов, таких как разделение в градиенте плотности фиколл-пак. Согласно некоторым вариантам реализации $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток используют при подготовительном первом размножении. Согласно некоторым вариантам реализации $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на контейнер используют при подготовительном первом размножении. Согласно некоторым вариантам реализации $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на GREX-10 используют при подготовительном первом размножении. Согласно некоторым вариантам реализации $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на GREX-100 используют при подготовительном первом размножении.

[00670] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах REP согласно описанию в примерах, где представлен пример протокола оценки репликативной

некомпетентности облученных аллогенных МКПК.

[00671] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на 14 день меньше исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день подготовительного первого размножения.

[00672] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 день не увеличилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день подготовительного первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00673] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 день не увеличилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день подготовительного первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 15 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 15 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00674] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МКПК. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно варианту реализации, отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет приблизительно от 1 до 25, приблизительно от 1 до 50, приблизительно от 1 до 100, приблизительно от 1 до 125, приблизительно от 1 до 150, приблизительно от 1 до 175, приблизительно от 1 до 200, приблизительно от 1 до 225,

приблизительно от 1 до 250, приблизительно от 1 до 275, приблизительно от 1 до 300, приблизительно от 1 до 325, приблизительно от 1 до 350, приблизительно от 1 до 375, приблизительно от 1 до 400 или приблизительно от 1 до 500. Согласно варианту реализации отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 50 и до 1 к 300. Согласно варианту реализации, отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 100 и до 1 к 200.

[00675] Согласно варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе, требуют отношения, составляющего приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. Согласно другому варианту реализации процедуры подготовительного первого размножения, описанные в настоящем документе, требуют отношения, составляющего приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации подготовительное первое размножение, описанное в настоящем документе, требует приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации подготовительное первое размножение, описанное в настоящем документе, требует приблизительно $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток. Согласно еще одному варианту реализации подготовительное первое размножение требует наличия одной четвертой, одной трети, пяти двенадцатых или половины количества фидерных клеток, используемых при быстром втором размножении.

[00676] Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении содержит $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении содержит OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 30 нг OKT-3 на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой флакон GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг OKT-3 на $2,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг OKT-3 на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой флакон GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и $2,5 \times$

10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 15 мкг ОКТ-3 и 2,5 × 10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 15 мкг ОКТ-3 на 2,5 × 10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00677] Согласно варианту реализации для процедур подготовительного первого размножения, описанных в настоящем документе, требуется избыток фидерных клеток относительно TIL в ходе второго размножения. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), взятые из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. МКПК получают с применением стандартных способов, таких как разделение в градиенте плотности фиколл-пак. Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие (иАПК) клетки используют вместо МКПК.

[00678] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, в том числе в примерах процедур на на чертежах и в разделах примеров.

[00679] Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие клетки используют при подготовительном первом размножении в качестве замены или в комбинации с МКПК.

2. Цитокины

[00680] В описанных здесь способах размножения обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, ИЛ-2, как известно в данной области техники.

[00681] Как вариант, возможно также применение комбинаций цитокинов для подготовительного первого размножения TIL, при этом комбинации содержат два или более цитокина из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21,согласно общему описанию в международной публикации WO 2015/189356 и WO 2015/189357, явным образом и полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, возможные комбинации включают ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-2 и ИЛ-21, ИЛ-15 и ИЛ-21, и ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, причем последняя комбинация, в частности, находит применение во многих вариантах реализации. Использование комбинаций цитокинов особенно благоприятствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток, как описано в настоящем документе.

ТАБЛИЦА 4: Последовательности аминокислот интерлейкинов.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:3 рекомбинантный ИЛ-2 человека	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL 60 EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS

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

ЭТАП C: Переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению

[00682] В некоторых случаях смешанная популяция TIL, полученная при подготовительном первом размножении (которое может включать размножение, иногда называемое пре-REP), в том числе, например, популяция TIL, полученная, например, на этапе B как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), может быть подвергнута быстрому второму размножению (которое может включать размножение, иногда называемое Протоколом Быстрого размножения (REP)), а затем криоконсервирована согласно обсуждению ниже. Аналогичным образом, при использовании в терапии генетически модифицированных TIL, размноженная при

подготовительном первом размножении популяция TIL или размноженная при быстром втором размножении популяция TIL может быть подвергнута генетическим модификациям для подходящей обработки до этапа размножения или после подготовительного первого размножения и до быстрого второго размножения.

[00683] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при подготовительном первом размножении (например, на этапе B, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) хранят до проведения фенотипирования для отбора. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при подготовительном первом размножении (например, на этапе B, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), не хранят и непосредственно переходят к их быстрому второму размножению. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при подготовительном первом размножении, не криоконсервируют после указанного подготовительного первого размножения и до быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней после фрагментации опухоли и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через приблизительно 3- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через приблизительно 3- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 4- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 4- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 5- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 5- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 6- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 6- 8 дней после фрагментации и/или

инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 7- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения.

[00684] Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 1- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 1- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит через 2- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит через 2- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит через 3- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к второму размножению происходит через 3- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 4- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 4- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 5- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому

второму размножению происходит через 5- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 6- 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 6- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 7- 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 7 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению происходит через 8 дней после фрагментации и/или инициации этапа первого подготовительного размножения.

[00685] Согласно некоторым вариантам реализации TIL не помещают на хранение после первичного первого размножения перед быстрым вторым размножением, и непосредственно приступают к их быстрому второму размножению (например, согласно некоторым вариантам реализации отсутствует хранение при переходе от этапа B к этапу D, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанный переход происходит в закрытой системе согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации после подготовительного первого размножения TIL приступают непосредственно к быстрому второму размножению второй популяции TIL без периода перехода.

[00686] Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению, например, этап C в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный единственный используемый биореактор представляет собой, например, GREX-10 или GREX-100. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор с закрытой системой представляет собой единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению включает масштабирование размера контейнеров. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере меньшего размера, чем контейнер для быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации подготовительное первое размножение осуществляют в GREX-100 и быстрое

второе размножение осуществляют в GREX-500.

ЭТАП D: Быстрое второе размножение

[00687] Согласно некоторым вариантам реализации популяцию клеток TIL дополнительно размножают после сбора и подготовительного первого размножения, после этапа A и этапа B, и перехода, называемого этапом C, как указано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Указанное дополнительное размножение называется в настоящем документе быстрым вторым размножением, которое может включать процессы размножения, обычно называемые в данной области техники процессом быстрого размножения (протокол быстрого размножения, или REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Указанное быстрое второе размножение обычно осуществляют с применением культуральной среды, содержащей ряд компонентов, в том числе фидерные клетки, источник цитокинов и антитело против CD3 в газопроницаемом контейнере. Согласно некоторым вариантам реализации через 1 день, 2 дня, 3 дня или 4 дня после инициации быстрого второго размножения (*т.е.* на 8, 9, 10 или 11 дни полного процесса Gen 3) TIL переносят в контейнер большего объема.

[00688] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение (которое может включать размножение, иногда называемое REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) TIL может быть проведено с применением любых флаконов или контейнеров для TIL, известных специалистам в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4, дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней или 10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 1 -9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 1-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 2-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 2-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 3-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 3-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 4-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 4-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение

TIL может продолжаться в течение приблизительно 5-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 5-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 6-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 6-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 7-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 7-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 8-9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 8-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 9-10 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 1 дня после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 2 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 3 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 4 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 5 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 6 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 7 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 8 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 9 дней после инициации быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 10 дней после инициации быстрого второго размножения.

[00689] Согласно варианту реализации быстрое второе размножение может быть проведено в газопроницаемом контейнере с применением способов согласно настоящему

описанию (включая, например, размножение, называемое REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL размножают при быстром втором размножении в присутствии ИЛ-2, OKT-3 и фидерных клеток (также называемых в настоящем документе «антигенпрезентирующими клетками»). Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL размножают при быстром втором размножении в присутствии ИЛ-2, OKT-3 и фидерных клеток, при этом указанные фидерные клетки добавляют до конечной концентрации, в 2 раза, 2,4, 2,5, 3 раза, 3,5 раза или 4 раза превышающей концентрацию фидерных клеток при подготовительном первом размножении. Например, TIL могут быть быстро размножены с применением неспецифической стимуляции Т-клеточных рецепторов в присутствии интерлейкина-2 (ИЛ-2) или интерлейкина-15 (ИЛ-15). Указанный неспецифический стимул для Т-клеточного рецептора может включать, например, антитело против CD3, например, приблизительно 30 нг/мл OKT3, моноклональное антитело мыши против CD3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси, или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния) или UHCT-1 (коммерчески доступное от BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США). TIL могут быть размножены для индукции дальнейшей стимуляции TIL in vitro посредством включения одного или более антигенов в ходе второго размножения, в том числе их антигенных частей, таких как эпитоп(ы), рака, которые могут необязательно экспрессироваться с вектора, такого как связывающий лейкоцитарный антиген человека A2 (HLA-A2) пептид, *например,* 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 л) или gpl 00:209-217 (210M), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, такого как 300 МЕ/мл ИЛ-2 или ИЛ-15. Другие подходящие антигены могут включать, *например,* NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназу, MAGE-A3, SSX SSX-2 и VEGFR2, или их антигенные части. TIL могут также быть быстро размножены посредством рестимуляции тем же антигеном (антигенами) рака, которым(и) сенсибилизируют HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. Как вариант, TIL можно дополнительно рестимулировать, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными аллогенными HLA-A2+ лимфоцитами и ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации рестимуляция происходит в рамках второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и ИЛ-2.

[00690] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл,

приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или от 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00691] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит антитело OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 30 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 30 нг/мл до 60 нг/мл антитела OKT-3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 60 нг/мл OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело OKT-3 представляет собой муромонаб.

[00692] Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации среда для быстрого второго размножения содержит 500 мл культуральной среды и 30 мкг OKT-3 на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой флакон GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации среда для быстрого второго размножения содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 60 нг/мл OKT-3 и $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 мкг OKT-3, и $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00693] Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит

6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации среда содержит от 5×10^8 до $7,5 \times 10^8$антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит OKT-3. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит 500 мл культуральной среды и 30 мкг OKT-3 на контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации указанный контейнер представляет собой флакон GREX100 MCS. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 60 нг/мл OKT-3, и от 5×10^8 до $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток. Согласно некоторым вариантам реализации среда при быстром втором размножении содержит 500 мл культуральной среды и 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 мкг OKT-3, и от 5×10^8 и $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток на контейнер.

[00694] Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит один или более агонистов TNFRSF в клеточной культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF содержит агонист 4-1BB. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB, и указанный агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из урелумаба, утомилумаба, EU-101, слитого белка, и их фрагментов, производных, вариантов, биоаналогов и комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в клеточной культуральной среде от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист TNFRSF добавляют в концентрации, достаточной для достижения концентрации в клеточной культуральной среде от 20 мкг/мл до 40 мкг/мл.

[00695] Согласно некоторым вариантам реализации наряду с одним или более агонистов TNFRSF клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2 в начальной концентрации приблизительно 3000 МЕ/мл и антитело OKT-3 в начальной концентрации приблизительно 30 нг/мл, и при этом указанный один или более агонистов TNFRSF включает агонист 4-1BB.

[00696] Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21 используют в качестве комбинации в ходе второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены в ходе второго размножения, включая, например в процессы этапа D в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также с описанием в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 используют в качестве комбинации в ходе второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены в процессы этапа D в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), согласно описанию в настоящем

документе.

[00697] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение может быть проведено в клеточной культуральной среде с добавками, содержащей ИЛ-2, OKT-3, антигенпрезентирующие фидерные клетки и необязательно агонист TNFRSF. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в клеточной культуральной среде с добавками. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клеточная культуральная среда с добавками содержит ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации вторая клеточная культуральная среда содержит ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК; также называемые антигенпрезентирующими фидерными клетками). Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (*т.е.* антигенпрезентирующие клетки).

[00698] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 160 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 140 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 120 МЕ/мл ИЛ-15 или приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-15. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15.

[00699] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 4 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 3 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации

культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно от 5 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-21. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21.

[00700] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК) представляют собой МКПК. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК и/или антигенпрезентирующим клеткам при быстром размножении и/или втором размножении составляет приблизительно от 1 до 10, приблизительно от 1 до 15, приблизительно от 1 до 20, приблизительно от 1 до 25, приблизительно от 1 до 30, приблизительно от 1 до 35, приблизительно от 1 до 40, приблизительно от 1 до 45, приблизительно от 1 до 50, приблизительно от 1 до 75, приблизительно от 1 до 100, приблизительно от 1 до 125, приблизительно от 1 до 150, приблизительно от 1 до 175, приблизительно от 1 до 200, приблизительно от 1 до 225, приблизительно от 1 до 250, приблизительно от 1 до 275, приблизительно от 1 до 300, приблизительно от 1 до 325, приблизительно от 1 до 350, приблизительно от 1 до 375, приблизительно от 1 до 400 или приблизительно от 1 до 500. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК при быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 к 50 и до 1 к 300. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК при быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 к 100 и до 1 к 200.

[00701] В одном из вариантов осуществления REP и/или быстрое второе размножение проводят в колбах, при этом основная масса TIL смешивается со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, при этом концентрация питающих клеток составляет по меньшей мере 1,1 раза (1,1X), 1,2X, 1,3X, 1,4X, 1,5X, 1.6X, 1.7X, 1,8X, 1,8X, 2X, 2,1X2,2X, 2,3X, 2,4X, 2,5X, 2,6X, 2,7X, 2,8X, 2,9X, 3,0X, 3,1X, 3,2X, 3,3X, 3,4X, 3,5X, 3,6X, 3,7X, 3,8X, 3,9X или 4,0X концентрация питающих клеток при первичном первом разложении, 30 нг/мл OKT3 антитело к CD3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2 в 150 мл среды. Замену среды проводят (обычно заменяют 2/3 среды путем аспирации 2/3 отработанной среды и замены равным объемом свежей среды) до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную ростовую камеру. Альтернативные ростовые камеры включают флаконы G-REX и газопроницаемые контейнеры, более подробно описанные

ниже.

[00702] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение (которое может включать процессы, называемые процессом REP) продолжается 7-9 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение продолжается 7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение продолжается 8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение продолжается 9 дней.

[00703] В варианте осуществления второе расширение (которое может включать расширения, называемые REP, а также расширения, указанные на этапе D на фиг. 1 (в частности, *например,* на фиг. 1B и/или фиг. 1C), может быть выполнено в объеме 500 мл газопроницаемые колбы со 100-сантиметровым газопроницаемым кремниевым дном (G-Rex 100, коммерчески доступный от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 TIL можно культивировать с PBMC в 400 мл 50/50 среды с добавлением 5% сыворотки AB человека, 3000 МЕ на мл ИЛ-2 и 30 нг на мл анти-CD3 (OKT3). Флаконы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO_2. На 5 день 250 мл супернатанта могут быть извлечены и помещены в центрифужные флаконы и центрифугированы при 1500 об/мин (491 × g) в течение 10 минут. Клеточный осадок TIL может быть ресуспендирован с 150 мл свежей среды с 5% AB сыворотки человека, 6000 МЕ/мл ИЛ-2, и возвращен в исходные флаконы GREX-100. При последовательном размножении TIL во флаконах GREX-100 на 10 или 11 день указанные TIL могут быть перемещены во флакон большего размера, такой как GREX-500. Клетки могут быть собраны на 14 день в культуре. Клетки могут быть собраны на 15 день в культуре. Клетки могут быть собраны на на 16 день в культуре. Согласно некоторым вариантам реализации замену среды проводят до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную ростовую камеру. Согласно некоторым вариантам реализации 2/3 среды заменяют путем аспирации отработанной среды и замены равным объемом свежей среды. Согласно некоторым вариантам реализации альтернативные ростовые камеры включают флаконы GREX и газопроницаемые контейнеры, как более подробно описано ниже.

[00704] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в процессах размножения согласно описанию в настоящем документе, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом применяют для предотвращения и/или уменьшения экспериментальной изменчивости, частично обусловленной изменчивостью содержащих сыворотку сред от партии к партии.

[00705] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах реализации

базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими: CTS™ OpTmizer™ Базальная среда для увеличения Т-клеток, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальная необходимая среда (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и модифицированную среду Дульбекко-Искова.

[00706] Согласно некоторым вариантам реализации сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки CTS™ OpTmizer заменитель сыворотки для иммунных клеток CTS™, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[00707] Согласно некоторым вариантам реализации заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement применяют со стандартными ростовыми средами, включая, не ограничиваясь перечисленными, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, CST™ AIM-V SFM, среду для размножения Т-клеток без ксеногенных компонентов LymphoONE™, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по Искову.

[00708] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки (% об.) в указанной бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет

приблизительно 3% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[00709] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific). Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00710] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно

среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), и конечная концентрация 2-меркаптоэтанола в среде составляет 55 мкМ.

[00711] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в

концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[00712] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[00713] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в международной PCT-публикации WO/1998/030679, включенной в настоящий документ посредством ссылки, подходят для применения согласно настоящему изобретению. В указанной публикации описана бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток. Указанная бессывороточная, эукариотическая клетка культуральная среда включает базальную клеточную культуральную среду с добавлением бессывороточной добавки, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной культуральной среды для эукариотических клеток содержит или получена путем комбинирования одного или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более следовых элементов, и одного или более антибиотиков. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин или заменитель альбумина и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы,

состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), ростовой среды RPMI и модифицированной Исковым среды Дульбекко.

[00714] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация глицина в среде с определенным составом находится в диапазоне от приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-гистидина составляет приблизительно 5-250 мг/л, концентрация L-изолейцина составляет приблизительно 5-300 мг/л, концентрация L-метионина составляет приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-фенилаланина составляет приблизительно 5-400 мг/л, концентрация L-пролина составляет приблизительно 1-1000 мг/л, концентрация L- гидроксипролина составляет приблизительно 1-45 мг/л, концентрация L-серина составляет приблизительно 1-250 мг/л, концентрация L-треонина составляет приблизительно 10-500 мг/л, концентрация L-триптофана составляет приблизительно 2-110 мг/л, концентрация L-тирозина составляет приблизительно 3-175 мг/л, концентрация L-валина составляет приблизительно 5-500 мг/л, концентрация тиамина составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация восстановленного глутатиона составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация L-аскорбиновая кислота-2-фосфата составляет приблизительно 1-200 мг/л, концентрация насыщенного железом трансферрина составляет приблизительно 1-50 мг/л, концентрация инсулина составляет приблизительно 1-100 мг/л, концентрация селенита натрия составляет приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л, и концентрация альбумина (например, AlbuMAX® I) составляет приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[00715] Согласно некоторым вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в IX среде» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в конечных концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации IX среды» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанная бессывороточная добавка содержит не содержащие следовых элементов ингредиенты, типы и концентрации которых указаны в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации добавки» в таблице A ниже.

Таблица А: Концентрации ингредиентов, не содержащих следовых элементов

Ингредиент	Предпочтительный вариант реализации добавки (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в IX среде (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант реализации в IX среде (мг/л) (Приблизительно)
Глицин	150	5-200	53
L-Гистидин	940	5-250	183
L-Изолейцин	3400	5-300	615
L-Метионин	90	5-200	44
L-Фенилаланин	1800	5-400	336
L-Пролин	4000	1-1000	600
L-Гидроксипролин	100	1-45	15
L-Серин	800	1-250	162
L-Треонин	2200	10-500	425
L-Триптофан	440	2-110	82
L-Тирозин	77	3-175	84
L-Валин	2400	5-500	454
Тиамин	33	1-20	9
Восстановленный глутатион	10	1-20	1,5
Аскорбиновая кислота-2-PO_4 (Соль Mg)	330	1-200	50
Трансферрин (насыщенный железом	55	1-50	8
Инсулин	100	1-100	10
Натрия селенит	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83 000	5000-50 000	12 500

[00716] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации в среду с определенным составом добавляют до приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия. В среду с определенным составом может быть дополнительно добавлен L-глутамин

(конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ), 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[00717] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в источнике: Smith, et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) подходят для применения согласно настоящему изобретению. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды, и добавляли 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[00718] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры, необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известный как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

[00719] Согласно варианту реализации осуществляют быстрое второе размножение (в том числе размножение, называемое REP), которое дополнительно включает этап, на котором выбирают TIL на основании улучшенной реактивности в отношении опухоли. Может быть использован любой метод отбора, известный в данной области техники. Например, способы, описанные в опубликованной заявке на патент США №2016/0010058 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, могут использоваться для выбора TIL с улучшенной реактивностью в отношении опухоли.

[00720] Необязательно, после быстрого второго размножения (в том числе размножения, называемого размножением REP) может быть выполнен анализ жизнеспособности клеток с применением стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, на образце смешанных TIL может быть проведен анализ вытеснения трипанового синего, который избирательно помечает мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. Согласно некоторым вариантам реализации в образцах TIL могут быть подсчитаны клетки и определена их жизнеспособность с использованием автоматизированного счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Лоуренс, Массачусетс). Согласно некоторым вариантам реализации жизнеспособность определяют в соответствии со стандартным протоколом автоматического счетчика клеток Cellometer K2 Image Cytometer.

[00721] Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются за счет соматической рекомбинации ограниченного, но значительного количества генных сегментов. Указанные генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразие), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующее применение иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Согласно настоящему изобретению предложен способ получения TIL, которые демонстрируют и

увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при втором размножении, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанное увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к тяжелой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к легкой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к Т-клеточному рецептору. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к одному из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии TCRab (*т.е.* TCRα/β).

[00722] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для быстрого второго размножения (*например,* иногда называемая CM2 или второй клеточной культуральной средой), содержит ИЛ-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно описано ниже. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для быстрого второго размножения (*например,* иногда называемая CM2 или второй клеточной культуральной средой), содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 мкг/флакон OKT-3, а также $7,5 \times 10^8$ антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), как более подробно описано ниже. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для быстрого второго размножения (*например,* иногда называемая CM2 или второй клеточной культуральной средой), содержит ИЛ-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно описано ниже. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для быстрого второго размножения (*например,* иногда называемая CM2 или второй клеточной культуральной средой), содержит 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 мкг/флакон OKT-3, а также 5×10^8 антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), как более подробно описано ниже.

[00723] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение, например, этап D в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации биореактор используют в

качестве контейнера. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представлен, например, G-REX-100 или G-REX-500. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-500.

1. Фидерные клетки и антигенпрезентирующие клетки

[00724] Согласно варианту реализации для процедур быстрого второго размножения, описанных в настоящем документе (например, включающих размножение, таких как описанные для этапа D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), а также процедур, называемых REP) требуется избыток фидерных клеток при REP размножении TIL и/или при быстром втором размножении. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), взятые из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. МКПК получают с применением стандартных способов, таких как разделение в градиенте плотности фиколл-пак.

[00725] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах REP согласно описанию в примерах, где приведен пример протокола для оценки репликативной некомпетентности облученных аллогенных МКПК.

[00726] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедуре размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на 7 или 14 день меньше количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (т.е. день начала второго размножения).

[00727] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедуре размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 день и 14 день не увеличилось относительно количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (т.е. день начала второго размножения). Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 60 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 60 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00728] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток,

культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 день и 14 день не увеличилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (*m.e.* день начала второго размножения). Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30-60 нг/мл антитела OKT3 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[00729] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МКПК. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно варианту реализации отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет приблизительно 1 к 10, приблизительно 1 к 25, приблизительно 1 к 50, приблизительно 1 к 100, приблизительно 1 к 125, приблизительно 1 к 150, приблизительно 1 к 175, приблизительно 1 к 200, приблизительно 1 к 225, приблизительно 1 к 250, приблизительно 1 к 275, приблизительно 1 к 300, приблизительно 1 к 325, приблизительно 1 к 350, приблизительно 1 к 375, приблизительно 1 к 400 или приблизительно 1 к 500. Согласно варианту реализации, отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 50 и до 1 к 300. Согласно варианту реализации, отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 100 и до 1 к 200.

[00730] Согласно варианту реализации второе размножение процедур описанные в настоящем документе, требуют отношения, составляющего приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. Согласно варианту реализации второе размножение процедур описанные в настоящем документе, требуют отношения, составляющего приблизительно $7{,}5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. Согласно другому варианту реализации для процедур второго размножения согласно описанию в настоящем документе требуется отношение, соответствующее приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. Согласно другому варианту реализации для процедур второго размножения согласно описанию в настоящем документе требуется отношение, соответствующее приблизительно $7{,}5 \times 10^8$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации для процедур второго размножения согласно описанию в настоящем документе требуется приблизительно 5×10^8 фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации для процедур второго размножения

согласно описанию в настоящем документе требуется приблизительно 7,5 × 10^8 фидерных клеток на приблизительно 25 × 10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации быстрое второе размножение требует в два раза большего количества фидерных клеток, чем быстрое второе размножение. Согласно еще одному варианту реализации, если подготовительное первое размножение, описанное в настоящем документе, требует приблизительно 2,5 × 10^8 фидерных клеток, то быстрое второе размножение требует приблизительно 5 × 10^8 фидерных клеток. Согласно еще одному варианту реализации, если подготовительное первое размножение, описанное в настоящем документе, требует приблизительно 2,5 × 10^8 фидерных клеток, то быстрое второе размножение требует приблизительно 7,5 × 10^8 фидерных клеток. Согласно еще одному варианту реализации быстрое второе размножение требует в два раза (2,0X), 2,5X, 3,0X, 3,5X или 4,0X больше фидерных клеток, чем подготовительное первое размножение.

[00731] Согласно варианту реализации для процедур быстрого второго размножения, описанных в настоящем документе, требуется избыток фидерных клеток при быстром втором размножении. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), взятые из стандартных единиц цельной крови от аллогенных здоровых доноров крови. Указанные МКПК получают с применением стандартных способов, такие как разделение в градиенте плотности фиколл-пак. Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие (иАПК) клетки используют вместо МКПК. Согласно некоторым вариантам реализации МКПК добавляют при быстром втором размножении в концентрации, в два раза превышающей концентрацию МКПК, добавленных при подготовительном первом размножении.

[00732] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, в том числе в примерах процедур на на чертежах и в разделах примеров.

[00733] Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие клетки используют при быстром втором размножении в качестве замены или в комбинации с МКПК.

2. Цитокины

[00734] В описанных здесь способах быстрого второго размножения обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, ИЛ-2, как известно в данной области техники.

[00735] Как вариант, возможно также применение комбинаций цитокинов для быстрого второго размножения TIL, при этом комбинации содержат два или более цитокина из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21,согласно общему описанию в международной публикации WO 2015/189356 и WO 2015/189357, явным образом и полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, возможные комбинации включают ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-2 и ИЛ-21, ИЛ-15 и ИЛ-21, и ИЛ-2, ИЛ-15 и

ИЛ-21, причем последняя комбинация, в частности, находит применение во многих вариантах реализации. Использование комбинаций цитокинов особенно благоприятствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток согласно описанию в настоящем документе.

ЭТАП E: Сбор TIL

[00736] После этапа быстрого второго размножения клетки могут быть собраны. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов размножения, например, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL собирают после двух этапов размножения, например, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL собирают после двух этапов размножения, одного подготовительного первого размножения и одного быстрого второго размножения, например, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[00737] TIL могут быть собраны любым подходящим стерильным способом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора TIL хорошо известны в данной области, и любые такие известные способы могут быть использованы в предложенном процессе. Согласно некоторым вариантам реализации TILS собирают с использованием автоматизированной системы.

[00738] Коллекторы клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны из различных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. В предложенных способах можно использовать любой коллектор клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный коллектор клеток и/или система обработки клеток представляет собой мембранный коллектор клеток. Согласно некоторым вариантам реализации сбор клеток осуществляют с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (изготовитель - Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому инструменту или устройству, изготавливаемому любым поставщиком, которое может перекачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, такие как вращающаяся мембрана или вращающийся фильтр, в среде стерильной и/или закрытой системы, обеспечивая непрерывный поток и обработку клеток с удалением супернатанта или клеточной культуральной среды без оседания. Согласно некоторым вариантам реализации указанные коллектор клеток и/или система обработки клеток могут выполнять разделение клеток, промывание, замену жидкостей, концентрирование и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе

[00739] Согласно некоторым вариантам реализации быстрое второе размножение, например, этап D в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют

биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации биореактор используют в качестве контейнера. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представлен, например, G-REX-100 или G-REX-500. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации используемый биореактор представляет собой G-REX-500.

[00740] Согласно некоторым вариантам реализации этап E в соответствии с фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), осуществляют в соответствии с процессами, описанными в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации доступ к закрытой системе осуществляется посредством шприцев в стерильных условиях для поддержания стерильности и закрытого характера системы. Согласно некоторым вариантам реализации используют закрытую систему согласно описанию в настоящем документе.

[00741] Согласно некоторым вариантам реализации TIL собирают в соответствии со способами, описанными в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации TIL на 14-16 день собирают с применением способов согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации TIL собирают через 14 дней с применением способов согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации TIL собирают через 15 дней с применением способов согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации TIL собирают через 16 дней с применением способов согласно описанию в настоящем документе.

ЭТАП F: Получение итогового состава/ Перенос в пакет для инфузии

[00742] После завершения этапов A-E, как указано в примере порядка на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и подробно описано здесь и выше, клетки переносят в контейнер, чтобы использовать для введения пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации после получения терапевтически достаточного числа TIL с применением способов размножения, описанных выше, их переносят в контейнер, чтобы использовать для введения пациенту.

[00743] Согласно варианту реализации TIL, размноженные с применением способов согласно настоящему описанию, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. Согласно варианту реализации указанная фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные согласно описанию в настоящем документе, могут быть введены любым подходящим путем, известным в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно продолжается приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение

Относительное содержание фидерных клеток МКПК

[00744] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (см., например, фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), включают антитело против CD3, *например*, OKT-3. Антитело против CD3 в комбинации с ИЛ-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Указанный эффект можно наблюдать с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')2, причем первые в общем случае являются предпочтительными;; см., например, источник: Tsoukas et al., J. Immunol. **1985,** 135, 1719, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки.

[00745] Согласно варианту реализации количество слоев фидерных МКПК вычисляют следующим образом:

A. объем Т-клетки (диаметр 10 мкм): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 523{,}6$ мкм^3

B. колонка G-Rex 100 (M) высотой 40 мкм (4 клетки): $V = (4/3)\,\pi r^3 = 4\times10^{12}$ мкм^3

C. Количество клеток, требуемое для заполнения колонки B: 4×10^{12} мкм^3/ 523,6 мкм^3= $7{,}6\times10^8$ мкм^3* 0,64=$4{,}86\times10^8$

D. Количество клеток, которые могут быть оптимально активированы в 4мерном пространстве: $4{,}86\times10^{8/}24=20{,}25\times10^6$

E. Количество фидерных клеток и TIL, экстраполированное для G-Rex 500: TIL: 100×10^6 и фидерные клетки: $2{,}5\times10^9$

В указанных расчетах используют приблизительное количество мононуклеарных клеток, необходимое для обеспечения икосаэдрической геометрии для активации TIL в цилиндре с основанием 100 см^2. Указанный расчет дает экспериментальный результат~5×10^8 для пороговой активации Т-клеток, который близко воспроизводит экспериментальные данные NCI.[(1)] (C) Множитель (0,64) представляет собой статистическую плотность упаковки для эквивалентных сфер, рассчитанную Jaeger и Nagel в 1992 [(2)]. (D) Делитель 24 представляет собой количество эквивалентных сфер, которые могут контактировать с аналогичным объектом в 4-мерном пространстве, «число Ньютона»[(3)].

[(1)] Jin, Jianjian, et.al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.

[(2)] Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[(3)] O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

[00746] Согласно варианту реализации количество антигенпрезентирующих фидерных клеток, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, составляет приблизительно половину количества антигенпрезентирующих фидерных клеток, внесенных экзогенно при быстром втором размножении. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает проведение подготовительного

первого размножения в клеточной культуральной среде, которая содержит приблизительно на 50% меньше антигенпрезентирующих клеток по сравнению с клеточной культуральной средой для быстрого второго размножения.

[00747] Согласно другому варианту реализации количество антигенпрезентирующих фидерных клеток (АПК), внесенных экзогенно при быстром втором размножении, больше числа АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении.

[00748] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 20:1.

[00749] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[00750] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 9:1.

[00751] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 8:1.

[00752] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 7:1.

[00753] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 6:1.

[00754] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 5:1.

[00755] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[00756] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных

экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[00757] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[00758] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[00759] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[00760] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,6:1.

[00761] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[00762] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[00763] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[00764] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[00765] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[00766] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных

экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2:1.

[00767] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[00768] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 5:1.

[00769] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[00770] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[00771] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[00772] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[00773] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[00774] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,6:1.

[00775] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[00776] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных

экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[00777] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[00778] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) приблизительно 2:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[00779] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[00780] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, составляет точно или приблизительно 2:1.

[00781] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, к количеству АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, составляет точно или приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 или 5:1.

[00782] Согласно другому варианту реализации число АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, составляет точно или приблизительно 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ или $3,5\times10^8$ АПК, а число АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, составляет точно или приблизительно $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$, $6,6\times10^8$, $6,7\times10^8$, $6,8\times10^8$, $6,9\times10^8$, 7×10^8, $7,1\times10^8$, $7,2\times10^8$, $7,3\times10^8$, $7,4\times10^8$, $7,5\times10^8$, $7,6\times10^8$, $7,7\times10^8$, $7,8\times10^8$, $7,9\times10^8$, 8×10^8, $8,1\times10^8$, $8,2\times10^8$, $8,3\times10^8$, $8,4\times10^8$, $8,5\times10^8$, $8,6\times10^8$, $8,7\times10^8$, $8,8\times10^8$, $8,9\times10^8$, 9×10^8, $9,1\times10^8$, $9,2\times10^8$, $9,3\times10^8$, $9,4\times10^8$, $9,5\times10^8$, $9,6\times10^8$, $9,7\times10^8$, $9,8\times10^8$, $9,9\times10^8$ или 1×10^9 АПК.

[00783] Согласно другому варианту реализации число АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) 3×10^8 АПК, а число АПК,

внесенных экзогенно при быстром втором размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 4×10^8 АПК до (точно или приблизительно) $7,5\times10^8$ АПК.

[00784] Согласно другому варианту реализации число АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2×10^8 АПК до (точно или приблизительно) $2,5\times10^8$ АПК, а число АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) $5,5\times10^8$ АПК.

[00785] Согласно другому варианту реализации число АПК, внесенных экзогенно при подготовительном первом размножении, составляет точно или приблизительно $2,5\times10^8$ АПК, а число АПК, внесенных экзогенно при быстром втором размножении, составляет точно или приблизительно 5×10^8 АПК.

[00786] Согласно варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), добавленное на 0 день подготовительного первого размножения, составляет приблизительно половину количества МКПК, добавленного на 7 день подготовительного первого размножения (*например,* 7 день указанного способа). Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает добавление антигенпрезентирующих клеток на 0 день подготовительного первого размножения в первую популяцию TIL и добавление антигенпрезентирующих клеток на 7 день во вторую популяцию TIL, при этом количество антигенпрезентирующих клеток, добавленное на 0 день, составляет приблизительно 50% от количества антигенпрезентирующих клеток, добавленного на 7 день подготовительного первого размножения (*например,* 7 день указанного способа).

[00787] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенное экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, больше количества МКПК, внесенного экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения.

[00788] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $4,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00789] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00790] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) 2×10^6 АПК/см^2 до (точно или приблизительно) 3×10^6 АПК/см^2.

[00791] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно 2×10^6 АПК/см^2.

[00792] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 2×10^6, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$ или $4,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00793] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00794] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[00795] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00796] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,0\times10^6$ АПК/см^2.

[00797] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно $2,5\times10^6$ АПК/см^2, $2,6\times10^6$ АПК/см^2, $2,7\times10^6$ АПК/см^2, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$, $4,5\times10^6$, $4,6\times10^6$, $4,7\times10^6$, $4,8\times10^6$, $4,9\times10^6$, 5×10^6, $5,1\times10^6$, $5,2\times10^6$, $5,3\times10^6$, $5,4\times10^6$, $5,5\times10^6$, $5,6\times10^6$, $5,7\times10^6$, $5,8\times10^6$, $5,9\times10^6$, 6×10^6, $6,1\times10^6$, $6,2\times10^6$, $6,3\times10^6$, $6,4\times10^6$, $6,5\times10^6$, $6,6\times10^6$, $6,7\times10^6$, $6,8\times10^6$, $6,9\times10^6$, 7×10^6, $7,1\times10^6$, $7,2\times10^6$, $7,3\times10^6$, $7,4\times10^6$ или $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00798] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно $1,0\times10^6$, $1,1\times10^6$, $1,2\times10^6$, $1,3\times10^6$, $1,4\times10^6$, $1,5\times10^6$, $1,6\times10^6$, $1,7\times10^6$, $1,8\times10^6$, $1,9\times10^6$, 2×10^6, $2,1\times10^6$, $2,2\times10^6$, $2,3\times10^6$, $2,4\times10^6$, $2,5\times10^6$, $2,6\times10^6$, $2,7\times10^6$, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6, $4,1\times10^6$, $4,2\times10^6$, $4,3\times10^6$, $4,4\times10^6$ или $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно $2,5\times10^6$ АПК/см^2, $2,6\times10^6$ АПК/см^2, $2,7\times10^6$ АПК/см^2, $2,8\times10^6$, $2,9\times10^6$, 3×10^6, $3,1\times10^6$, $3,2\times10^6$, $3,3\times10^6$, $3,4\times10^6$, $3,5\times10^6$, $3,6\times10^6$, $3,7\times10^6$, $3,8\times10^6$, $3,9\times10^6$, 4×10^6,

$4{,}1\times10^6$, $4{,}2\times10^6$, $4{,}3\times10^6$, $4{,}4\times10^6$, $4{,}5\times10^6$, $4{,}6\times10^6$, $4{,}7\times10^6$, $4{,}8\times10^6$, $4{,}9\times10^6$, 5×10^6, $5{,}1\times10^6$, $5{,}2\times10^6$, $5{,}3\times10^6$, $5{,}4\times10^6$, $5{,}5\times10^6$, $5{,}6\times10^6$, $5{,}7\times10^6$, $5{,}8\times10^6$, $5{,}9\times10^6$, 6×10^6, $6{,}1\times10^6$, $6{,}2\times10^6$, $6{,}3\times10^6$, $6{,}4\times10^6$, $6{,}5\times10^6$, $6{,}6\times10^6$, $6{,}7\times10^6$, $6{,}8\times10^6$, $6{,}9\times10^6$, 7×10^6, $7{,}1\times10^6$, $7{,}2\times10^6$, $7{,}3\times10^6$, $7{,}4\times10^6$ или $7{,}5\times10^6$ АПК/см^2.

[00799] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1{,}0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $4{,}5\times10^6$ АПК/см^2, и АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2{,}5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $7{,}5\times10^6$ АПК/см^2.

[00800] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1{,}5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3{,}5\times10^6$ АПК/см^2, и АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $3{,}5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) 6×10^6 АПК/см^2.

[00801] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) 2×10^6 АПК/см^2 до (точно или приблизительно) 3×10^6 АПК/см^2, и АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) 4×10^6 АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $5{,}5\times10^6$ АПК/см^2.

[00802] Согласно другому варианту реализации АПК, внесенные экзогенно при подготовительном первом размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно 2×10^6 АПК/см^2 и АПК, внесенные экзогенно при быстром втором размножении, высевают в культуральный флакон с плотностью, составляющей точно или приблизительно 4×10^6 АПК/см^2.

[00803] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству МКПК, внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 20:1.

[00804] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству МКПК, внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[00805] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству МКПК, внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого

размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 9:1.

[00806] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 8:1.

[00807] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 7:1.

[00808] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 6:1.

[00809] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 5:1.

[00810] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[00811] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[00812] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[00813] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день

подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[00814] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[00815] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,6:1.

[00816] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[00817] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[00818] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[00819] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[00820] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[00821] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день

подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2:1.

[00822] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[00823] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 5:1.

[00824] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[00825] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[00826] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[00827] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[00828] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[00829] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день

подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,6:1.

[00830] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[00831] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[00832] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[00833] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[00834] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[00835] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, составляет точно или приблизительно 2:1.

[00836] Согласно другому варианту реализации отношение числа АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, к количеству АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, составляет точно или приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 или 5:1.

[00837] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения,

составляет точно или приблизительно 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ или $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК), и число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, составляет точно или приблизительно $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$, $6,6\times10^8$, $6,7\times10^8$, $6,8\times10^8$, $6,9\times10^8$, 7×10^8, $7,1\times10^8$, $7,2\times10^8$, $7,3\times10^8$, $7,4\times10^8$, $7,5\times10^8$, $7,6\times10^8$, $7,7\times10^8$, $7,8\times10^8$, $7,9\times10^8$, 8×10^8, $8,1\times10^8$, $8,2\times10^8$, $8,3\times10^8$, $8,4\times10^8$, $8,5\times10^8$, $8,6\times10^8$, $8,7\times10^8$, $8,8\times10^8$, $8,9\times10^8$, 9×10^8, $9,1\times10^8$, $9,2\times10^8$, $9,3\times10^8$, $9,4\times10^8$, $9,5\times10^8$, $9,6\times10^8$, $9,7\times10^8$, $9,8\times10^8$, $9,9\times10^8$ или 1×10^9 АПК (включая, например, МКПК).

[00838] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1×10^8 АПК (включая, например, МКПК) до (точно или приблизительно) $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК), и число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $3,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК) до (точно или приблизительно) 1×10^9 АПК (включая, например, МКПК).

[00839] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) 3×10^8 АПК (включая, например, МКПК), и число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 4×10^8 АПК (включая, например, МКПК) до (точно или приблизительно) $7,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК).

[00840] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2×10^8 АПК (включая, например, МКПК) до (точно или приблизительно) $2,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК), и число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК) до (точно или приблизительно) $5,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК).

[00841] Согласно другому варианту реализации число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения, составляет точно или приблизительно $2,5\times10^8$ АПК (включая, например, МКПК) и число АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, составляет точно или приблизительно 5×10^8 АПК (включая, например,

МКПК).

[00842] Согласно варианту реализации количество слоев АПК (включая, например, МКПК), добавленных на 0 день подготовительного первого размножения, составляет приблизительно половину количества слоев АПК (включая, например, МКПК), добавленных на 7 день быстрого второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает добавление слоев антигенпрезентирующих клеток на 0 день подготовительного первого размножения в первую популяцию TIL и добавление слоев антигенпрезентирующих клеток на 7 день во вторую популяцию TIL, при этом количество слоев антигенпрезентирующих клеток, добавленных на 0 день, составляет приблизительно 50% от количества слоев антигенпрезентирующих клеток, добавленных на 7 день.

[00843] Согласно другому варианту реализации количество слоев АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 7 день быстрого второго размножения, больше количества слоев АПК (включая, например, МКПК), внесенных экзогенно на 0 день подготовительного первого размножения.

[00844] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 2 слоев клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 4 слоя клеток.

[00845] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 1 слой клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 3 слоя клеток.

[00846] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 1,5 слоев клеток до (точно или приблизительно) 2,5 слоев клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 3 слоя клеток.

[00847] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 1 слой клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 2 слоя клеток.

[00848] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине(точно или приблизительно) 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3 слоя клеток, и 7 день быстрого второго

размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8 слоев клеток.

[00849] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 1 слоя клеток до (точно или приблизительно) 2 слоя клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 3 слоев клеток до (точно или приблизительно) 10 слоев клеток.

[00850] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 2 слоев клеток до (точно или приблизительно) 3 слоев клеток, и 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 4 слоев клеток до (точно или приблизительно) 8 слоев клеток.

[00851] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 2 слоя клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине от (точно или приблизительно) 4 слоев клеток до (точно или приблизительно) 8 слоев клеток.

[00852] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 1, 2 или 3 слоя клеток, а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) при средней толщине (точно или приблизительно) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 слоев клеток.

[00853] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:10.

[00854] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с

первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:8.

[00855] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:7.

[00856] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:6.

[00857] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:5.

[00858] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного

первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:4.

[00859] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:3.

[00860] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:2.

[00861] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,2 до (точно или приблизительно) 1:8.

[00862] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,3 до (точно или приблизительно) 1:7.

[00863] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого

размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,4 до (точно или приблизительно) 1:6.

[00864] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,5 до (точно или приблизительно) 1:5.

[00865] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,6 до (точно или приблизительно) 1:4.

[00866] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,7 до (точно или приблизительно) 1:3.5.

[00867] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму

количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,8 до (точно или приблизительно) 1:3.

[00868] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) к указанному второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,9 до (точно или приблизительно) 1:2.5.

[00869] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) ко второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), составляет точно или приблизительно 1: 2.

[00870] Согласно другому варианту реализации 0 день подготовительного первого размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с первой средней толщиной, равной первому количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), а 7 день быстрого второго размножения проходит в присутствии наслоенных АПК (включая, например, МКПК) с второй средней толщиной, равной второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК), при этом отношение указанного первого количества слоев АПК (включая, например, МКПК) ко второму количеству слоев АПК (включая, например, МКПК) составляет точно или приблизительно 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3, 1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9 или 1:10.

[00871] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[00872] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,5\times10^6$ АПК/см^2, и число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[00873] Согласно некоторым вариантам реализации число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,0\times10^6$ АПК/см^2, и число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

Необязательные компоненты клеточной среды

1. Антитела против CD3

[00874] Согласно некоторым вариантам реализации указанный культуральная среда, используемая в способах размножения, описанных в настоящем документе (см., например, фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), включает антитело против CD3. Антитело против CD3 в комбинации с ИЛ-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Указанный эффект можно наблюдать с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')2, причем первые в общем случае являются предпочтительными;; см., например, источник: Tsoukas et al., J. Immunol. **1985,** 135, 1719, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки.

[00875] Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует ряд подходящих антител к CD3 человека, которые можно использовать согласно настоящему изобретению, в том числе поликлональные и моноклональные антитела против CD3 человека от различных млекопитающих, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, антитела мышей, человека, приматов, крыс и собачьих. Согласно конкретным вариантам реализации применяют антитело против CD3 OKT3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси, или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния).

ТАБЛИЦА 5: Последовательности аминокислот муромонаба (примеры антитела OKT-3)

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:1 Тяжелая цепь муромонаба	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL 180

	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:2 Легкая цепь муромонаба	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

2. Агонисты 4-1BB (CD137)

[00876] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда для подготовительного первого размножения и/или быстрого второго размножения содержит агонист TNFRSF. Согласно варианту реализации указанный агонист TNFRSF представляет собой агонист 4-1BB (CD137). Указанный агонист 4-1BB может представлять собой любую связывающую 4-1BB молекулу, известную в данной области техники. Указанная связывающая 4-1BB молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способные к связыванию 4-1BB человека или млекопитающих. Агонисты 4-1BB или связывающие 4-1BB молекулы могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (*например,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (*например,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекул иммуноглобулина. Указанные агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула могут содержать как тяжелую, так и легкую цепь. В настоящем документе термин связывающая молекула также включает антитела (в том числе полноразмерные антитела), моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (*например,* биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела, и фрагменты антител, *например,* Fab-фрагменты, F(ab′)-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессионной библиотекой Fab, связывающие эпитопы фрагменты чего-либо из вышеперечисленного, и сконструированные формы антител, *например,* молекулы scFv, которые связываются с 4-1BB. Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB

представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой полностью человеческое антитело. Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации агонисты 4-1BB для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела против 4-1BB, антител человека против 4-1BB, антитела мыши против 4-1BB, антитела млекопитающих против 4-1BB, моноклональные антитела против 4-1BB, поликлональные антитела против 4-1BB, химерные антитела против 4-1BB, аднектины против 4-1BB, доменные антитела против 4-1BB, одноцепочечные фрагменты антител против 4-1BB, фрагменты тяжелых цепей антител против 4-1BB, фрагменты легких цепей антител против 4-1BB, слитые анти-4-1BB белки и фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги перечисленного. Известно, что агонистические антитела против 4-1BB вызывают сильный иммунный ответ. Lee, et al., PLOS One **2013**, 8, e69677. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (*т.е.* антитело, происходящее из моноклональной линии клеток) против 4-1BB. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB представляет собой EU-101 (Eutilex Co. Ltd.), утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб или урелумаб, или их фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог.

[00877] Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула могут также представлять собой слитый белок. Согласно предпочтительному варианту реализации мультимерный агонист 4-1BB, такой как тримерный или гексамерный агонист 4-1BB (с тремя или шестью лигандсвязывающими доменами), может лучше индуцировать кластеризацию рецептора (4-1BBL) и образование внутреннего клеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое обычно содержит два лигандсвязывающих домена. Тримерные (тривалентные) или гексамерные (или шестивалентные) или более мультимерные слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительное соединение двух или более из указанных слитых белков описаны, *например,* в источнике: Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics **2013,** 12, 2735-47.

[00878] Известно, что агонистические в отношении 4-1BB антитела и слитые белки вызывают сильный иммунный ответ. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, которые специфически связываются с антигеном 4-1BB способом, позволяющим снизить токсичность. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистические в отношении 4-1BB моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют антитело-зависимую клеточную токсичность

(АЗКЦ), например, цитотоксичность NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистические в отношении 4-1BB моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистические в отношении 4-1BB моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Согласно некоторым вариантам реализации агонист 4-1BB представляет собой агонистические в отношении 4-1BB моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют функциональность Fc-области.

[00879] Согласно некоторым вариантам реализации указанные агонисты 4-1BB характеризуются связыванием с 4-1BB (SEQ ID NO: 9) с высокой аффинностью и агонистической активностью. Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с 4-1BB человека (SEQ ID NO:9). Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с 4-1BB мыши (SEQ ID NO:10). Последовательности аминокислот антигена 4-1B, с которым связывается агонист 4-1BB или связывающая 4-1BB молекула, обобщены в таблице 6.

ТАБЛИЦА 6. Последовательности аминокислот антигенов 4-1BB.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:9 4-1BB человека, представитель 9 суперсемейства рецепторов факторов некроза опухоли (Homo sapiens)	MGNSCYNIVA TLLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCEQDCKQGQ ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLRF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQEEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
SEQ ID NO:10 4-1BB мыши, Представитель 9 суперсемейства рецепторов факторов некроза опухоли (Mus musculus)	MGNNCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLF LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH

	IFKQPFKKTT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

[00880] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 100 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 90 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 80 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 70 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 60 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 50 пМ или менее, связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 40 пМ или менее или связывает 4-1BB человека или мыши с K_D, равной приблизительно 30 пМ или менее.

[00881] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно 8×10^5 1/М·с, или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно 9×10^5 1/М·с, или быстрее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее или связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{assoc}, равной приблизительно 1×10^6 1/М·с, или быстрее.

[00882] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно 2×10^{-5} 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее или связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,9 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее или связывается с 4-1BB человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно 3×10^{-5} 1/с, или медленнее.

[00883] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист 4-1BB, который связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 10 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или

мыши с IC_{50}, равной приблизительно 9 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 8 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 7 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 6 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 5 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 4 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 3 нМ или менее, связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 2 нМ или менее, или связывается с 4-1BB человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 1 нМ или менее.

[00884] Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой утомилумаб, также известный как PF-05082566 или MOR-7480, или его фрагмент, производное, вариант или биоаналог. Утомилумаб доступен от Pfizer, Inc. Утомилумаб представляет собой иммуноглобулин G2-лямбда, направленное против антигена [TNFRSF9 Homo sapiens (представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), 4-1BB, Т-клеточный антиген ILA, CD137)] моноклональное антитело Homo sapiens (полностью человеческое). Последовательности аминокислот утомилумаба приведены в таблице 7. Утомилумаб содержит сайты гликозилирования по Asn59 и Asn292; внутрицепочечные дисульфидные мостики тяжелых цепей в положениях 22-96 (V_H-V_L), 143-199 (C_H1-C_L), 256-316 (C_H2) и 362-420 (C_H3); внутрицепочечные дисульфидные мостики легких цепей в положениях 22'-87' (V_H-V_L) и 136'-195' (C_H1-C_L); межцепочечные дисульфидные мостики тяжелая цепь/тяжелая цепь в изоформе IgG2A в положениях 218-218, 219-219, 222-222 и 225-225, в изоформе IgG2A/B в положениях 218-130, 219-219, 222-222 и 225-225, и в изоформе IgG2B в положениях 219-130 (2), 222-222 и 225-225; и межцепочечные дисульфидные мостики тяжелая цепь/легкая цепь в изоформе IgG2A в положениях 130-213' (2), в изоформе IgG2A/B в положениях 218-213' и 130-213', и в изоформе IgG2B в положениях 218-213' (2). Получение и свойства утомилумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №8821867; №8337850; и №9468678, и в опубликованной международной заявке на патент WO 2012/032433 A1, содержание которых включено посредством ссылок в настоящий документ. Доклинические характеристик утомилумаба описаны в источнике: Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. **2012,** 61, 1721-33. Текущие клинические испытания утомилумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают испытания с идентификаторами Национальных институтов здравоохранения США (clinicaltrials.gov) NCT02444793, NCT01307267, NCT02315066 и NCT02554812.

[00885] Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, заданную SEQ ID NO:11, и легкую цепь, заданную SEQ ID NO:12. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. Согласно варианту реализации агонист 4-

1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:12, соответственно.

[00886] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей утомилумаба. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:13, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:14, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14.

[00887] Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 и SEQ ID NO:17, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 и SEQ ID NO:20, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00888] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста 4-1BB, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к утомилумабу. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела содержит антитело к 4-1BB, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой утомилумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист 4-1BB, зарегистрированное или представленное на регистрацию, отличающееся тем, что оно входит в состав, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собойутомилумаб. Указанное антитело - агонист 4-1BB может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой утомилумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой утомилумаб.

ТАБЛИЦА 7. Последовательности аминокислот антител - агонистов 4-1BB, родственных утомилумабу.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:11 тяжелая цепь утомилумаба	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTNY 60 SPSFQGQVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY

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

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

[00889] Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой моноклональное антитело урелумаб, также известный как BMS-663513 и 20H4.9.h4a, или его фрагмент, производное, вариант или биоаналог. Урелумаб доступен от Bristol-Myers Squibb, Inc. и Creative Biolabs, Inc. Урелумаб представляет собой иммуноглобулин G4-каппа, направленное против [TNFRSF9 Homo sapiens (представитель 9 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли, 4-1BB, Т-клеточный антиген ILA, CD137)] моноклональное антитело Homo sapiens (полностью человеческое). Последовательности аминокислот урелумаба приведены в таблице EE. Урелумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 298 (и 298'); внутрицепочечные дисульфидные мостики тяжелых цепей в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 262-322 (C_H2) и 368-426 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 262''-322'' и 368''-426''); внутрицепочечные дисульфидные мостики легких цепей в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 136'-196' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 136'''-196'''); межцепочечные дисульфидные мостики тяжелая цепь/тяжелая цепь в положениях 227-227'' и 230-230''; и межцепочечный дисульфидные мостики тяжелая цепь/легкая цепь в положениях 135-216' и 135''-216'''. Получение и свойства урелумаба и его вариантов и фрагментов описаны в патентах США №7288638 и №8962804, содержание которых включено посредством ссылок в настоящий документ. Доклинические и клинические характеристики урелумаба описаны в источнике: Segal, et al., Clin. Cancer Res. **2016,** *доступном по ссылке*:

http:/dx.doi.org/ 10.1158/1078-0432.CCR-16-1272. Текущие клинические испытания урелумаба при различных гематологических и солидных опухолях включают испытания с идентификаторами Национальных институтов здравоохранения США (clinicaltrials.gov) NCT01775631, NCT02110082, NCT02253992 и NCT01471210.

[00890] Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелую цепь, заданную SEQ ID NO:21 и легкую цепь, заданную SEQ ID NO:22. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:21 и SEQ ID NO:22, соответственно.

[00891] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей урелумаба. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи (V_H) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:23, и вариабельная область легкой цепи (V_L) агониста 4-1BB содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:24, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей

мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно. Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24.

[00892] Согласно варианту реализации агонист 4-1BB содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 и SEQ ID NO:27, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:29 и SEQ ID NO:30, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00893] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста 4-1BB, одобренного, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к урелумабу. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к 4-1BB, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой урелумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист 4-1BB, зарегистрированное или представленное на регистрацию, причем указанный агонист 4-1BB антитело входит в состав, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собойурелумаб. Указанное антитело - агонист 4-1BB может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой урелумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог предложен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же самые или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом

продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой урелумаб.

ТАБЛИЦА 8: Последовательности аминокислот антител - агонистов 4-1BB, родственных урелумабу.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:21 тяжелая цепь урелумаба	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFS GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN 60 PSLESRVTIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS 120 SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTK TYTCNVDHKP SNTKVDKRVE SKYGPPCPPC PAPEFLGGPS 240 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT 360 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE 420 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK 448
SEQ ID NO:22 легкая цепь урелумаба	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTKVEIKR TVAAPSVFIF 120 PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST 180 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC 216
SEQ ID NO:23 вариабельная тяжелая цепь урелумаба	MKHLWFFLLL VAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP 60 EKGLEWIGEI NHGGYVTYNP SLESRVTISV DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP 120
SEQ ID NO:24 вариабельная легкая цепь урелумаба	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP 60 GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ 110

SEQ ID NO:25 CDR1 тяжелой цепи урелумаба	GYYWS 5
SEQ ID NO:26 CDR2 тяжелой цепи урелумаба	EINHGGYVTY NPSLES 16
SEQ ID NO:27 CDR3 тяжелой цепи урелумаба	DYGPGNYDWY FDL 13
SEQ ID NO:28 CDR1 легкой цепи урелумаба	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:29 CDR2 легкой цепи урелумаба	DASNRAT 7
SEQ ID NO:30 CDR3 легкой цепи урелумаба	QQRSDWPPAL T 11

[00894] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB выбран из группы, состоящей из 1D8, 3Elor, 4B4 (BioLegend 309809), H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532), BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX), 145501 (Leinco Technologies B591), антитела, продуцируемого линией клеток, депонированной в ATCC как HB-11248, и раскрытого в патенте США №6974863, 5F4 (BioLegend 31 1503), C65-485 (BD Pharmingen 559446), антител, раскрытых в опубликованной заявке на патент США US 2005/0095244, антител, раскрытых в патенте США №7288638 (таких как 20H4.9-IgGl (BMS-663031)), антител, раскрытых в патенте США №6887673 (таких как 4E9 или BMS-554271), антител, раскрытых в патенте США №7214493, антител, раскрытых в патенте США №6303121, антител, раскрытых в патенте США №6569997, антител, раскрытых в патенте США №6905685 (таких как 4E9 или BMS-554271), антител, раскрытых в патенте США №6362325 (таких как 1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3El), антител, раскрытых в патенте США №6974863 (таких как 53A2); антител, раскрытых в патенте США №6210669 (таких как 1D8, 3B8 или 3El), антител, описанных в патенте США №5928893, антител, раскрытых в патенте США №6303121, антител, раскрытых в патенте США №6569997, антител, раскрытых в опубликованных международных заявках на патент WO 2012/177788, WO 2015/119923 и WO 2010/042433, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов или биоаналогов, причем содержание всех вышеперечисленных патентов или опубликованных заявок на патент включено в

настоящий документ посредством ссылки.

[00895] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистический в отношении 4-1BB слитый белок, описанный в опубликованных международных заявках на патент WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1 и WO 2010/078966 A1; опубликованных заявках на патент США US 2011/0027218 A1, US 2015/0126709 A1, US 2011/0111494 A1, US 2015/0110734 A1 и US 2015/0126710 A1; и патентах США №9359420, №9340599, №8921519 и №8450460, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[00896] Согласно варианту реализации агонист 4-1BB представляет собой агонистический слитый белок 4-1BB, изображенный на структуре IA (слитый белок с C-концевым Fc-фрагментом антитела) или структуре IB (слитый белок с N-концевым Fc-фрагментом антитела), или его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог, как показано на **фиг. 110:**

В структурах I-A и I-B цилиндры соответствуют индивидуальным полипептидным связывающим доменам. Структуры I-A и I-B содержат три линейно соединенных связывающих TNFRSF домена, происходящие из, *например,* 4-1BBL (лиганд 4-1BB, лиганд CD137 (CD137L) или представитель 9 суперсемейства факторов некроза опухоли (TNFSF9)) или антитела, которое связывает 4-1BB, при укладке которых образуется тривалентный белок, который затем присоединяется к второму тривалентному белку через IgG1-Fc (включая домены C_H3 и C_H2), который, соответственно, используется для соединения двух трехвалентных белков дисульфидными связями (небольшие удлиненные овалы), стабилизации структуры и обеспечения агонистов, способных объединять внутриклеточные сигнальные домены шести рецепторов и сигнальных белков с образованием сигнального комплекса. Связывающие домены TNFRSF, изображенные в виде цилиндров, могут представлять собой домены scFv, содержащие, *например*, цепь 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. Может использоваться любой дизайн домена scFv, такой как, например, описанные в источниках: 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 источниках, цитируемых в других местах в тексте настоящего документа. Структуры слитых белков указанной формы описаны в патентах США №9359420, №9340599, №8921519 и №8450460, описания которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

[00897] Последовательности аминокислот других полипептидных доменов структуры I-A приведены в таблице 9. Домен Fc предпочтительно включает 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 присоединения C-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов реализации, приведенных в SEQ

ID NO: 32 - SEQ ID NO: 41, включая линкеры, подходящие для слияния дополнительных полипептидов.

ТАБЛИЦА 9: Аминокислотные последовательности для слитых белков - агонистов TNFRSF, в том числе слитых белков - агонистов 4-1BB, имеющих дизайн слитых белков с С-концевыми Fc-фрагментами антител (структура I-A).

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:31 Fc-домен	KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW 60 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS 120 KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV 180 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 230
SEQ ID NO:32 линкер	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:33 линкер	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE 22
SEQ ID NO:34 линкер	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:35 линкер	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE 27
SEQ ID NO:36 линкер	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE 29
SEQ ID NO: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

[00898] Последовательности аминокислот других полипептидных доменов структуры I-B приведены в таблице 10. Если Fc-фрагмент антитела сливают с N-концом слитого белка - агониста TNFRSF, как в структуре I-B, последовательность Fc-модуля предпочтительно соответствует представленной в SEQ ID NO:42, а линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов реализации, представленных в SED ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

ТАБЛИЦА 10: Последовательности аминокислот слитых белков - агонистов TNFRSF, в том числе слитых белков - агонистов 4-1BB с дизайном слитого белка, содержащего N-концевой Fc-фрагмент антитела (структура I-B).

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:42 Fc-домен	METDTLLLWV LLLWVPAGNG DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT 60 CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK 120 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE 180 WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS 240 LSLSPG 246
SEQ ID NO:43 линкер	SGSGSGSGSG S 11
SEQ ID NO:44 линкер	SSSSSSGSGS GS 12
SEQ ID NO:45 линкер	SSSSSSGSGS GSGSGS 16

[00899] В одном из вариантов реализации слитый белок-агонист 4-1BB со структурами IA или IB содержит один или несколько связывающих доменов 4-1BB, выбранных из группы, состоящей из вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи утомилумаба, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи. цепи урелумаба, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи утомилумаба, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, выбранных из вариабельных тяжелых цепей и вариабельных легких цепей, описанных в таблице 10, любой комбинации вышеперечисленных вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи, а также их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[00900] Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов,

содержащих последовательность 4-1BBL. Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность, соответствующую SEQ ID NO:46. Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность растворимого 4-1BBL. Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, содержащих последовательность, соответствующую SEQ ID NO:47.

[00901] Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:13 и SEQ ID NO:14, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:23 и SEQ ID NO:24, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок-агонист 4-1BB в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих 4-1BB доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям V_H и V_L приведенным в таблице 11, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 11: Дополнительные полипептидные домены, подходящие для применения в качестве связывающих 4-1BB доменов в слитых белках или в качестве scFv-антител - агонистов 4-1BB.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQG MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVHLHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
SEQ ID NO:47	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY

растворимый домен 4-1BBL	KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSPRSE 168
SEQ ID NO:48 вариабельная тяжелая цепь 4B4-1-1, вариант 1	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
SEQ ID NO:49 вариабельная легкая цепь 4B4-1-1, вариант 1	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:50 вариабельная тяжелая цепь 4B4-1-1, вариант 2	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
SEQ ID NO:51 вариабельная легкая цепь 4B4-1-1, вариант 2	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSISGIPS 60 RFSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVYYCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:52 вариабельная тяжелая цепь H39E3-2	MDWTWRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 GKGLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRAEDT AVYYCARELT 120
SEQ ID NO:53 вариабельная легкая цепь H39E3-2	MEAPAQLLFL LLLWLPDTTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

[00902] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистический в отношении 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый связывающий 4-1BB домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий 4-1BB домен, (iv) второй пептидный

линкер, и (v) третий растворимый связывающий 4-1BB домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, при этом указанный дополнительный домен представляет собой домен Fab-фрагмента или Fc-фрагмента. Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистический в отношении 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый связывающий 4-1BB домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий 4-1BB домен, (iv) второй пептидный линкер, и (v) третий растворимый связывающий 4-1BB домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, при этом указанный дополнительный домен представляет собой домен Fab- или Fc-фрагмента, причем ни один из растворимых 4-1BB доменов не содержит области стебля (которая вносит вклад в тримеризацию и обеспечивает обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, однако не входит в состав связывающего 4-1BB домена), а первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[00903] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистический в отношении 4-1BB одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина суперсемейства факторов некроза опухоли (ФНО, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина суперсемейства ФНО, (iv) второй пептидный линкер, и (v) третий растворимый домен цитокина суперсемейства ФНО, причем ни один из растворимых доменов цитокина суперсемейства ФНО не содержит области стебля, а первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, при этом каждый домен цитокина суперсемейства ФНО представляет собой связывающий 4-1BB домен.

[00904] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой агонистическое в отношении 4-1BB scFv-антитело, содержащее любые из вышеперечисленных доменов V_H, соединенные с любыми из вышеперечисленных доменов V_L.

[00905] Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой антитело - агонист 4-1BB BPS Bioscience кат. № 79097-2, коммерчески доступное от BPS Bioscience, Сан-Диего, Калифорния, США. Согласно варианту реализации указанный агонист 4-1BB представляет собой антитело - агонист 4-1BB Creative Biolabs кат. № MOM-18179, коммерчески доступное от Creative Biolabs, Ширли, штат Нью-Йорк, США.

3. Агонисты OX40 (CD134)

[00906] Согласно варианту реализации указанный агонист TNFRSF представляет собой агонист OX40 (CD134). Указанный агонист OX40 может представлять собой любую связывающую OX40 молекулу, известную в данной области техники. Указанная связывающая OX40 молекула может представлять собой моноклональное антитело или слитый белок, способные к связыванию OX40 человека или млекопитающих. Агонисты OX40 или связывающие OX40 молекулы могут содержать тяжелую цепь иммуноглобулина любого изотипа (*например,* IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса

(*например,* IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекул иммуноглобулина. Агонист OX40 или связывающая OX40 молекула может содержать как тяжелую, так и легкую цепь. В настоящем документе термин связывающая молекула также включает антитела (в том числе полноразмерные антитела), моноклональные антитела (в том числе полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (*например,* биспецифические антитела), человеческие, гуманизированные или химерные антитела, и фрагменты антител, *например,* Fab-фрагменты, F(ab′)-фрагменты, фрагменты, продуцируемые экспрессионной библиотекой Fab, связывающие эпитопы фрагменты чего-либо из вышеперечисленного, и сконструированные формы антител, *например,* молекулы scFv, которые связываются с OX40. Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой полностью человеческое антитело. Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой антигенсвязывающий белок, который представляет собой гуманизированное антитело. Согласно некоторым вариантам реализации агонисты OX40 для применения в раскрытых в настоящем документе способах и композициях включают антитела против OX40, антитела человека против OX40, антитела мыши против OX40, антитела млекопитающих против OX40, моноклональные антитела против OX40, поликлональные антитела против OX40, химерные антитела против OX40, аднектины против OX40, доменные антитела против OX40, одноцепочечные фрагменты антител против OX40, фрагменты тяжелых цепей антител против OX40, фрагменты легких цепей антител против OX40, слитые анти-OX40 белки и фрагменты, производные, конъюгаты, варианты или биоаналоги перечисленного. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистическое гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело (*т.е.* антитело, происходящее из моноклональной линии клеток) против OX40.

[00907] Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист OX40 или связывающая OX40 молекула могут также представлять собой слитый белок. Слитые OX40-белки, содержащие Fc-домен, слитый с OX40L, описаны, например, в источнике: Sadun, et al., J. Immunother. **2009,** 182, 1481-89. Согласно предпочтительному варианту реализации мультимерный агонист OX40, такой как тримерный или гексамерный агонист OX40 (с тремя или шестью лигандсвязывающими доменами), может лучше индуцировать кластеризацию рецептора (OX40L) и образование внутреннего клеточного сигнального комплекса по сравнению с агонистическим моноклональным антителом, которое обычно содержит два лигандсвязывающих домена. Тримерные (тривалентные) или гексамерные (или шестивалентные) или более мультимерные слитые белки, содержащие три связывающих TNFRSF домена и IgG1-Fc, и, необязательно, дополнительное соединение двух или более из указанных слитых белков описаны, *например,* в источнике: Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics **2013,** 12, 2735-47.

[00908] Известно, что агонистические в отношении OX40 антитела и слитые белки

вызывают сильный иммунный ответ. Curti, et al., Cancer Res. **2013**, 73, 7189-98. Согласно предпочтительному варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело или слитый белок, которые специфически связываются с антигеном OX40 способом, позволяющим снизить токсичность. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистическое(ий) в отношении OX40 моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют антитело-зависимую клеточную токсичность (АЗКЦ), например, цитотоксичность NK-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистическое(ий) в отношении OX40 моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистическое(ий) в отношении OX40 моноклональное антитело или слитый белок белок, которые нейтрализуют комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). Согласно некоторым вариантам реализации агонист OX40 представляет собой агонистические в отношении OX40 моноклональное антитело или слитый белок, которые нейтрализуют функциональность Fc-области.

[00909] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонисты OX40 характеризуются связыванием с OX40 человека (SEQ ID NO:54) с высокой аффинностью и агонистической активностью. Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с OX40 человека (SEQ ID NO: 54). Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой связывающую молекулу, которая связывается с OX40 мыши (SEQ ID NO: 55). Последовательности аминокислот антигена OX40, с которым связывается агонист OX40 или связывающая OX40 молекула, обобщены в таблице 12.

ТАБЛИЦА 12: Последовательности аминокислот антигенов OX40.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:54 OX40 человека (Homo sapiens)	MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ 60 NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ 180 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
SEQ ID NO:55 OX40 мыши	MYVWVQQPTA LLLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60

(Mus musculus)	HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCTPTQD TVCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120 VDCVPCPPGH FSPGNNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLL ATLLWETQRP 180 TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPEG PAFAVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240 RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

[00910] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 100 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 90 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 80 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 70 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 60 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 50 пМ или менее, связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 40 пМ или менее или связывает OX40 человека или мыши с K_D, равной приблизительно 30 пМ или менее.

[00911] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно $7,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно 8×10^5 1/М·с, или быстрее, связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно $8,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее, связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно 9×10^5 1/М·с, или быстрее, связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно $9,5 \times 10^5$ 1/М·с, или быстрее или связывается с OX40 человека или мыши с k_{assoc}, равной приблизительно 1×10^6 1/М·с, или быстрее.

[00912] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно 2×10^{-5} 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,1 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,2 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,3 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,4 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,5 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,6 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее или связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,7 \times 10^{-5}$ 1/с, или медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно $2,8 \times 10^{-5}$ 1/с, или

медленнее, связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно 2,9 × 10^{-5} 1/с, или медленнее или связывается с OX40 человека или мыши с K_{dissoc}, равной приблизительно 3 × 10^{-5} 1/с, или медленнее.

[00913] Согласно некоторым вариантам реализации описанные композиции, процессы и способы включают агонист OX40, который связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 10 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 9 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 8 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 7 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 6 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 5 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 4 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 3 нМ или менее, связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 2 нМ или менее или связывается с OX40 человека или мыши с IC_{50}, равной приблизительно 1 нМ или менее.

[00914] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой таволиксизумаб, также известный как MEDI0562 или MEDI-0562. Таволиксизумаб доступен от MedImmune, дочерней компании AstraZeneca, Inc. Таволиксизумаб представляет собой иммуноглобулин G1-каппа, гуманизированное химерное моноклональное антитело против [TNFRSF4 Homo sapiens (представитель 4 суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (TNFR), OX40, CD134)]. Последовательности аминокислот таволиксизумаба приведены в таблице 13. Таволиксизумаб содержит сайты N-гликозилирования в положениях 301 и 301'', с фукозилированными комплексными биантеннарными гликанами типа CHO; внутрицепочечные дисульфидные мостики тяжелых цепей в положениях 22-95 (V_H-V_L), 148-204 (C_H1-C_L), 265-325 (C_H2) и 371-429 (C_H3) (и в положениях 22''-95'', 148''-204'', 265''-325'' и 371''-429''); внутрицепочечные дисульфидные мостики легких цепей в положениях 23'-88' (V_H-V_L) и 134'-194' (C_H1-C_L) (и в положениях 23'''-88''' и 134'''-194'''); межцепочечные дисульфидные мостики тяжелая цепь/тяжелая цепь в положениях 230-230'' и 233-233''; и межцепочечные дисульфидные мостики тяжелая цепь /легкая цепь в положениях 224-214' и 224''-214'''. Текущие клинические испытания таволиксизумаба при различных солидных опухолях включают испытания с идентификаторами Национальных институтов здравоохранения США (clinicaltrials.gov) NCT02318394 и NCT02705482.

[00915] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелую цепь, заданную SEQ ID NO:56, и легкую цепь, заданную SEQ ID NO:57. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. Согласно варианту реализации агонист

OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:56 и SEQ ID NO:57, соответственно.

[00916] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей таволиксизумаба. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи агониста OX40 (V_H) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:58, и вариабельная область легкой цепи агониста OX40 (V_L) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:59, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит scFv-антитело, содержащее области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59.

[00917] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:60, SEQ ID NO:61 и SEQ ID NO:62, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:63, SEQ ID NO:64 и SEQ ID NO:65, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00918] Согласно варианту реализации агонист OX40 представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста OX40, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к таволиксизумабу. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист OX40, зарегистрированный или представленный на регистрацию, при этом указанное антитело- агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собойтаволиксизумаб. Указанное антитело - агонист OX40 может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой таволиксизумаб.

ТАБЛИЦА 13: Последовательности аминокислот антител - агонистов OX40, родственных таволиксизумабу.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:56 тяжелая цепь таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVTVS 120

	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
SEQ ID NO:57 легкая цепь таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:58 вариабельная область тяжелой цепи таволиксизумаба	QVQLQESGPG LVKPSQTLSL TCAVYGGSFS SGYWNWIRKH PGKGLEYIGY ISYNGITYHN 60 PSLKSRITIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WGQGTLVT 118
SEQ ID NO:59 вариабельная область легкой цепи таволиксизумаба	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKLLIYY TSKLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQQ GSALPWTFGQ GTKVEIKR 108
SEQ ID NO:60 CDR1 тяжелой цепи таволиксизумаба	GSFSSGYWN 9
SEQ ID NO:61 CDR2 тяжелой цепи	YIGYISYNGI TYH 13

таволиксизумаба	
SEQ ID NO:62 CDR3 тяжелой цепи таволиксизумаба	RYKYDYDGGH AMDY 14
SEQ ID NO:63 CDR1 легкой цепи таволиксизумаба	QDISNYLN 8
SEQ ID NO:64 CDR2 легкой цепи таволиксизумаба	LLIYYTSKLH S 11
SEQ ID NO:65 CDR3 легкой цепи таволиксизумаба	QQGSALPW 8

[00919] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой 11D4, который представляет собой полностью человеческое антитело, доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 11D4 описаны в патентах США № 7960515; № 8236930; и № 9028824, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Последовательности аминокислот 11D4 приведены в таблице 14.

[00920] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелую цепь, заданную SEQ ID NO:66, и легкую цепь, заданную SEQ ID NO:67. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична

последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:66 и SEQ ID NO:67, соответственно.

[00921] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей 11D4. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи агониста OX40 (V_H) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:68, и вариабельная область легкой цепи агониста OX40 (V_L) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:69, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно.

[00922] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:70, SEQ ID NO:71 и SEQ ID NO:72, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74 и SEQ ID NO:75, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00923] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста OX40, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к 11D4. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 11D4. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования,

окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист OX40, зарегистрированный или представленный на регистрацию, при этом указанное антитело- агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой11D4. Указанное антитело -агонист OX40 может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 11D4. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 11D4.

ТАБЛИЦА 14: Последовательности аминокислот антител - агонистов OX40, родственных 11D4.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:66 тяжелая цепь 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVERKC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRVV 300 SVLTVVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPMLDSDGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK 444

SEQ ID NO:67 легкая цепь 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
SEQ ID NO:68 вариабельная область тяжелой цепи 11D4	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSY ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLFDYWGQ GTLVTVSS 118
SEQ ID NO:69 вариабельная область легкой цепи 11D4	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
SEQ ID NO:70 CDR1 тяжелой цепи 11D4	SYSMN 5
SEQ ID NO:71 CDR2 тяжелой цепи 11D4	YISSSSSTID YADSVKG 17
SEQ ID NO:72 CDR3 тяжелой цепи 11D4	ESGWYLFDY 9
SEQ ID NO:73 CDR1 легкой цепи 11D4	RASQGISSWL A 11
SEQ ID NO:74 CDR2 легкой цепи 11D4	AASSLQS 7
SEQ ID NO:75 CDR3 легкой цепи 11D4	QQYNSYPPT 9

[00924] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой 18D8, который представляет собой полностью человеческое антитело,

доступное от Pfizer, Inc. Получение и свойства 18D8описаны в патентах США № 7960515; № 8236930; и № 9028824, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Последовательности аминокислот 18D8 приведены в таблице 15.

[00925] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелую цепь, заданную SEQ ID NO:76, и легкую цепь, заданную SEQ ID NO:77. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно, или антигенсвязывающие фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), их варианты или конъюгаты. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит тяжелые и легкие цепи, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:76 и SEQ ID NO:77, соответственно.

[00926] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей 18D8. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи агониста OX40 (V_H) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:78, и вариабельная область легкой цепи агониста OX40 (V_L) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:79, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID

NO:79, соответственно.

[00927] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81 и SEQ ID NO:82, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:83, SEQ ID NO:84 и SEQ ID NO:85, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00928] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста OX40, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к 18D8. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 18D8. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист OX40, зарегистрированный или представленный на регистрацию, при этом указанное антитело- агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой18D8. Указанное антитело - агонист OX40 может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 18D8. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой 18D8.

ТАБЛИЦА 15: Последовательности аминокислот антител - агонистов OX40, родственных 18D8.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:76 тяжелая цепь 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTVSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSVLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPM LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:77 легкая цепь 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
SEQ ID NO:78 вариабельная область тяжелой цепи 18D8	EVQLVESGGG LVQPGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTTV 120 TVSS 124
SEQ ID NO:79 вариабельная область легкой цепи 18D8	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPTFGQG TKVEIK 106
SEQ ID NO:80 CDR1 тяжелой	DYAMH 5

цепи 18D8	
SEQ ID NO:81 CDR2 тяжелой цепи 18D8	GISWNSGSIG YADSVKG 17
SEQ ID NO:82 CDR3 тяжелой цепи 18D8	DQSTADYYFY YGMDV 15
SEQ ID NO:83 CDR1 легкой цепи 18D8	RASQSVSSYL A 11
SEQ ID NO:84 CDR2 легкой цепи 18D8	DASNRAT 7
SEQ ID NO:85 CDR3 легкой цепи 18D8	QQRSNWPT 8

[00929] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представлен Hu119-122, который представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu119-122 описаны в патентах США № 9006399 и № 9163085, и в международной патентной публикации WO 2012/027328, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Последовательности аминокислот Hu119-122 приведены в таблице 16.

[00930] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей Hu119-122. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи агониста OX40 (V_H) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:86, и вариабельная область легкой цепи агониста OX40 (V_L) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:87, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям,

представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно.

[00931] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89 и SEQ ID NO:90, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:91, SEQ ID NO:92 и SEQ ID NO:93, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00932] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста OX40, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к Hu119-122. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu119-122. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист OX40, зарегистрированный или представленный на регистрацию, при этом указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собойHu119-122. Указанное антитело - агонист OX40 может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu119-122. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом

продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu119-122.

ТАБЛИЦА 16: Последовательности аминокислот антител - агонистов OX40, родственных Hu119-122.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:86 вариабельная область тяжелой цепи Hu119-122	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:87 вариабельная область легкой цепи Hu119-122	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:88 CDR1 тяжелой цепи Hu119-122	SHDMS 5
SEQ ID NO:89 CDR2 тяжелой цепи Hu119-122	AINSDGGSTY YPDTMER 17
SEQ ID NO:90 CDR3 тяжелой цепи Hu119-122	HYDDYYAWFA Y 11
SEQ ID NO:91 CDR1 легкой цепи Hu119-122	RASKSVSTSG YSYMH 15
SEQ ID NO:92 CDR2 легкой цепи Hu119-122	LASNLES 7
SEQ ID NO:93 CDR3 легкой цепи Hu119-122	QHSRELPLT 9

[00933] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представлен Hu106-222, который представляет собой гуманизированное антитело, доступное от GlaxoSmithKline plc. Получение и свойства Hu106-222 описаны в патентах США № 9006399 и № 9163085, и в международной патентной публикации WO

2012/027328, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Последовательности аминокислот Hu106-222 приведены в таблице 17.

[00934] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит CDR или вариабельные области (VR) тяжелых и легких цепей Hu106-222. Согласно варианту реализации вариабельная область тяжелой цепи агониста OX40 (V_H) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:94, и вариабельная область легкой цепи агониста OX40 (V_L) содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO:95, и ее варианты с консервативными заменами аминокислот. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 99% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 98% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 97% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 96% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно. Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно.

[00935] Согласно варианту реализации агонист OX40 содержит домены CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелых цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97 и SEQ ID NO:98, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот, и домены CDR1, CDR2 и CDR3 легких цепей, имеющие последовательности, представленные в SEQ ID NO:99, SEQ ID NO:100 и SEQ ID NO:101, соответственно, и их варианты с консервативными заменами аминокислот.

[00936] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой биоаналог моноклонального антитела - агониста OX40, одобренного органом контроля лекарственных средств применительно к Hu106-222. Согласно варианту реализации указанный биоаналог моноклонального антитела включает антитело к OX40, содержащее последовательность аминокислот, которая по меньшей мере на 97% идентична, *например,* на 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности аминокислот референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, и содержит одну или более посттрансляционных модификаций по сравнению с референсным медицинским продуктом или референсным биологическим продуктом, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu106-222. Согласно некоторым вариантам реализации указанная одна или более посттрансляционная модификация выбрана из одного или более из: гликозилирования, окисления, дезамидирования и усечения. Согласно некоторым

вариантам реализации указанный биоаналог представляет собой антитело - агонист OX40, зарегистрированный или представленный на регистрацию, при этом указанное антитело-агонист OX40 представлено в составе, который отличается от составов референсного медицинского продукта или референсного биологического продукта, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собойHu106-222. Указанное антитело - агонист OX40 может быть зарегистрировано регуляторным органом по контролю лекарственных средств, таким как FDA в США и/или EMA в Европейском Союзе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu106-222. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биоаналог представлен в виде композиции, которая дополнительно содержит одно или более вспомогательных веществ, при этом используют те же или другие одно или более вспомогательных веществ, что и в референсном медицинском продукте или референсном биологическом продукте, причем указанный референсный медицинский продукт или референсный биологический продукт представляет собой Hu106-222.

ТАБЛИЦА 17: Последовательности аминокислот антител - агонистов OX40, родственных Hu106-222.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:94 вариабельная область тяжелой цепи Hu106-222	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:95 вариабельная область легкой цепи Hu106-222	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISSLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
SEQ ID NO:96 CDR1 тяжелой цепи Hu106-222	DYSMH 5

SEQ ID NO:97 CDR2 тяжелой цепи Hu106-222	WINTETGEPT YADDFKG 17
SEQ ID NO:98 CDR3 тяжелой цепи Hu106-222	PYYDYVSYYA MDY 13
SEQ ID NO:99 CDR1 легкой цепи Hu106-222	KASQDVSTAV A 11
SEQ ID NO:100 CDR2 легкой цепи Hu106-222	SASYLYT 7
SEQ ID NO:101 CDR3 легкой цепи Hu106-222	QQHYSTPRT 9

[00937] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антитело-агонист OX40 представляет собой MEDI6469 (также называемое 9B12). MEDI6469 представляет собой моноклональное антитело мыши. Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585. Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой антитело, продуцируемое гибридомой 9B12, депонированной у Biovest Inc. (Малверн, Массачусетс, США), согласно описанию в источнике: Weinberg, et al., J. Immunother. **2006**, 29, 575-585, содержание которого включено в настоящий документ полностью посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит последовательности CDR MEDI6469. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи MEDI6469.

[00938] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой L106 BD (Pharmingen, продукт № 340420). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 содержит области CDR антитела L106 (BD Pharmingen, продукт № 340420). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области антитела L106 (BD Pharmingen, продукт №

340420). Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Кат. № 20073). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 содержит области CDR антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Кат. № 20073). Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи и/или последовательность вариабельной области легкой цепи антитела ACT35 (Santa Cruz Biotechnology, Кат. № 20073). Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело мыши против mCD134/mOX40 (клон OX86), коммерчески доступное от InVivoMAb, BioXcell Inc, Уэст-Лебанон, Нью-Хэмпшир.

[00939] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 выбирают из агонистов OX40, описанных в опубликованных международных заявках на патент WO 95/12673, WO 95/21925, WO 2006/121810, WO 2012/027328, WO 2013/028231, WO 2013/038191 и WO 2014/148895; заявке на европейский патент EP 0672141; опубликованных заявках на патент США US 2010/136030, US 2014/377284, US 2015/190506 и US 2015/132288 (в том числе клоны 20E5 и 12H3); и патентах США № 7504101, 7550140, 7622444, 7696175, 7960515, 7961515, 8133983, 9006399 и 9163085, содержание каждого из которых включено в настоящий документ полностью посредством ссылки.

[00940] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистический в отношении OX40 слитый белок, представленный структурой I-A (слитый с C-концевым Fc-фрагментом антитела белок) или структурой I-B (слитый с N-концевым Fc-фрагментом антитела белок) или его фрагмент, производное, конъюгат, вариант или биоаналог. Свойства структур I-A и I-B описаны выше, а также в патентах США № 9359420, № 9340599, № 8921519 и № 8450460, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Последовательности аминокислот полипептидных доменов структуры I-A приведены в таблице 9. Fc-домен предпочтительно содержит полный константный домен (аминокислоты 17-230 SEQ ID NO:31), полный шарнирный домен (аминокислоты 1-16 SEQ ID NO:31) или часть шарнирного домена (*например,* аминокислоты 4-16 SEQ ID NO:31). Предпочтительные линкеры для присоединения C-концевого Fc-антитела могут быть выбраны из вариантов реализации, представленных в SEQ ID NO:32 - SEQ ID NO:41, в том числе линкеров, подходящих для слияния с дополнительными полипептидами. Последовательности аминокислот полипептидных доменов структуры I-B также приведены в таблице 10. В тех случаях, когда Fc-фрагмент антитела сливают с N-концом слитого TNRFSF белка, как в структуре I-B, последовательность Fc-модуля предпочтительно представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:42, а линкерные последовательности предпочтительно выбраны из вариантов реализации, представленных в SED ID NO:43 - SEQ ID NO:45.

[00941] Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40,

соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, выбранных из группы, состоящей из вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи таволиксизумаба, вариабельной тяжелой цепи и вариабельной легкой цепи11D4, 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 17, любой комбинации перечисленных выше вариабельных тяжелых цепей и вариабельных легких цепей, и их фрагментов, производных, конъюгатов, вариантов и биоаналогов.

[00942] Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность OX40L. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность, соответствующую SEQ ID NO:102. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих растворимую последовательность OX40L. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40 соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность, соответствующую SEQ ID NO:103. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40 в соответствии со структурами I-A или I-B содержит один или более связывающих OX40 доменов, содержащих последовательность, соответствующую SEQ ID NO:104.

[00943] Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:58 и SEQ ID NO:59, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:68 и SEQ ID NO:69, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:78 и SEQ ID NO:79, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40

доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:86 и SEQ ID NO:87, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям, представленным в SEQ ID NO:94 и SEQ ID NO:95, соответственно, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером. Согласно варианту реализации слитый белок - агонист OX40, соответствующий структурам I-A или I-B, содержит один или более связывающих OX40 доменов, которые представляют собой домен scFv, содержащий области V_H и V_L, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична последовательностям V_H и V_L, приведенным в таблице 14, при этом указанные домены V_H и V_L соединены линкером.

ТАБЛИЦА 18: Дополнительные полипептидные домены, подходящие для применения в качестве связывающих OX40 домены в слитых белках (*например,* структуры I-A и I-B) или в качестве scFv-антител - агонистов OX40.

Идентификатор	**Последовательность (Однобуквенные обозначения аминокислот)**
SEQ ID NO:102 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLLVASV IQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPRIQ 60 SIKVQFTEYK KEKGFILTSQ KEDEIMKVQN NSVIINCDGF YLISLKGYFS QEVNISLHYQ 120 KDEEPLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDFHVNGGEL ILIHQNPGEF 180 CVL 183
SEQ ID NO:103 растворимый домен OX40L	SHRYPRIQSI KVQFTEYKKE KGFILTSQKE DEIMKVQNNS VIINCDGFYL ISLKGYFSQE 60 VNISLHYQKD EEPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGELIL 120 IHQNPGEFCV L 131
SEQ ID NO:104 растворимый домен OX40L (альтернативный вариант)	YPRIQSIKVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNNSVII NCDGFYLISL KGYFSQEVNI 60 SLHYQKDEEP LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVTT DNTSLDDFHV NGGELILIHQ 120 NPGEFCVL 128

SEQ ID NO:105 вариабельная тяжелая цепь 008	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWVRQA PGKGLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YSQVHYALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:106 вариабельная легкая цепь 008	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:107 вариабельная тяжелая цепь 011	EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYTMNWVRQA PGKGLEWVSS ISGGSTYYAD 60 SRKGRFTISR DNSKNTLYLQ MNNLRAEDTA VYYCARDRYF RQQNAFDYWG QGTLVTVSSA 120
SEQ ID NO:108 вариабельная легкая цепь 011	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYNHP TTFGQGTK 108
SEQ ID NO:109 вариабельная тяжелая цепь 021	EVQLVESGGG LVQPRGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWVRQA PGKGLEWVAV ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR YITLPNALDY WGQGTLVTVS 120
SEQ ID NO:110 вариабельная легкая цепь 021	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYKSNP PTFGQGTK 108
SEQ ID NO:111 вариабельная тяжелая цепь 023	EVQLVESGGG LVHPGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVMGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCARYDN VMGLYWFDYW GQGTLVTVSS 120
SEQ ID NO:112 вариабельная легкая цепь 023	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPAFGG GTKVEIKR 108

SEQ ID NO:113 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY INPYNDGTKY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYYCANYY GSSLSMDYWG QGTSVTVSS 119
SEQ ID NO:114 вариабельная область легкой цепи	DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY TSRLHSGVPS 60 RFSGSGSGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:115 вариабельная область тяжелой цепи	EVQLQQSGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMHWVKQS HGKSLEWIGG IYPNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYYCARMG YHGPHLDFDV WGAGTTVTVS 120 P 121
SEQ ID NO:116 вариабельная область легкой цепи	DIVMTQSHKF MSTSLGDRVS ITCKASQDVG AAVAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRHTGVPD 60 RFTGGGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPLTFGG GTKLEIKR 108
SEQ ID NO:117 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVKQA PGKGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQINNLKNED TATYFCANPY YDYVSYYAMD YWGHGTSVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:118 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISSLKAED TAVYYCANPY YDYVSYYAMD YWGQGTTVTV 120 SS 122
SEQ ID NO:119 вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107
SEQ ID NO:120 вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела	DIVMTQSHKF MSTSVRDRVS ITCKASQDVS TAVAWYQQKP GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYSTPRTFGG GTKLEIK 107

SEQ ID NO:121 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела	EVQLVESGGG LVQPGESLKL SCESNEYEFP SHDMSWVRKT PEKRLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFII SRDNTKKTLY LQMSSLRSED TALYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTLVTVSA 120
SEQ ID NO:122 вариабельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMVTVSS 120
SEQ ID NO:123 вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
SEQ ID NO:124 вариабельная область легкой цепи гуманизированного антитела	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHWY QQKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
SEQ ID NO:125 вариабельная область тяжелой цепи	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE 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 LSASLGGKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHKP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSISNLEP EDIATYYCLQ YDNLLTFGAG 120 TKLELK 126

[00944] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистический в отношении OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый связывающий OX40 домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый связывающий OX40 домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий OX40 домен, также содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, при этом указанный дополнительный домен представляет собой домен Fab-фрагмента или Fc-фрагмента. Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистический в отношении OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый связывающий OX40 домен, (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый

связывающий OX40 домен, (iv) второй пептидный линкер и (v) третий растворимый связывающий OX40 домен, дополнительно содержащий дополнительный домен на N-конце и/или C-конце, при этом указанный дополнительный домен представляет собой домен Fab- или Fc-фрагмента, причем каждый из указанных растворимых связывающих OX40 доменов не содержит области стебля (которая вносит вклад в тримеризацию и обеспечивает определенное расстояние до клеточной мембраны, однако не входит в состав связывающего OX40 домена), а первый и второй пептидные линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот.

[00945] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистический в отношении OX40 одноцепочечный слитый полипептид, содержащий (i) первый растворимый домен цитокина суперсемейства факторов некроза опухоли (ФНО), (ii) первый пептидный линкер, (iii) второй растворимый домен цитокина суперсемейства ФНО, (iv) второй пептидный линкер, и (v) третий растворимый домен цитокина суперсемейства ФНО, причем ни один из доменов цитокина суперсемейства ФНО не содержит области стебля, а первый и второй пептидный линкеры независимо имеют длину 3-8 аминокислот, при этом домен цитокина суперсемейства ФНО представляет собой связывающий OX40 домен.

[00946] Согласно некоторым вариантам реализации указанный агонист OX40 представляет собой MEDI6383. MEDI6383 представляет собой агонистический в отношении OX40 слитый белок и может быть получен согласно описанию в патенте США № 6312700, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ.

[00947] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистическое в отношении OX40 scFv-антитело, содержащее любые из вышеперечисленных доменов V_H, соединенных с любыми из вышеперечисленных доменов V_L.

[00948] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой моноклональное антитело - агонист OX40 Creative Biolabs MOM-18455, коммерчески доступное у Creative Biolabs, Inc., Ширли, штат Нью-Йорк, США

[00949] Согласно варианту реализации указанный агонист OX40 представляет собой агонистический в отношении OX40 клон антитела Ber-ACT35, коммерчески доступный от BioLegend, Inc., Сан-Диего, Калифорния, США.

Необязательный анализ жизнеспособности клеток

[00950] Необязательно после подготовительного первого размножения (называемого иногда начальным смешанным размножением) может быть проведен анализ жизнеспособности клеток с применением стандартных анализов, известных в данной области техники. Соответственно, согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает проведение анализа после подготовительного первого размножения. Например, в образце смешанных TIL может быть проведен анализ исключения трипанового синего, который избирательно помечает мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность. Другие анализы для тестирования жизнеспособности могут включать,

не ограничиваясь перечисленными, анализ с аламаровым синим; и МТТ-тест.

1. Подсчитанное количество клеток, жизнеспособность, проточная цитометрия

[00951] Согласно некоторым вариантам реализации измеряют количество клеток и/или жизнеспособность. Уровни маркеров экспрессии, таких как, не ограничиваясь перечисленными, CD3, CD4, CD8 и CD56, а также любых других, раскрытых или описанных в настоящем документе, могут быть измерены с помощью проточной цитометрии с антителами, например, но не ограничиваясь перечисленными, коммерчески доступных от BD Bio-sciences (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния), с использованием проточного цитометра FACSCanto™ (BD Biosciences). Клетки могут быть подсчитаны вручную с применением одноразового гемоцитометра C-Chip (VWR, Батавия, Иллинойс), а оценка жизнеспособности может быть проведена с применением любого способа, известного в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь указанным, окрашивание трипановым синим. Оценка жизнеспособности клеток может быть также проведена на основе описания в USSN 15/863634, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Оценка жизнеспособности клеток может быть также проведена на основе описания в Патентной публикации США № 2018/0280436 или Международной патентной публикации WO/2018/081473, обе из которых включены в настоящий документ полностью для любых целей.

[00952] В некоторых случаях смешанная популяция TIL может быть немедленно криоконсервирована с применением протоколов, обсуждаемых ниже. Как вариант, смешанная популяция TIL может быть подвергнута REP и затем криоконсервирована согласно обсуждению ниже. Аналогичным образом, при использовании в терапии генетически модифицированных TIL, смешанная популяция TIL или REP популяция TIL может быть подвергнута генетическим модификациям для подходящей обработки.

2. Культуры клеток

[00953] Согласно варианту реализации способ размножения TIL, в том числе способы, описанные ниже, а также в примере на фиг. 1, в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C, могут включать применение от приблизительно 5000 мл до приблизительно 25000 мл клеточной среды, приблизительно 5000 мл до приблизительно 10000 мл клеточной среды или приблизительно 5800 мл до приблизительно 8700 мл клеточной среды. Согласно некоторым вариантам реализации среда представляет собой бессывороточную среду. Согласно некоторым вариантам реализации среда при подготовительном первом размножении не содержит сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации среда при втором размножении не содержит сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации среда ни при подготовительном первом размножении, ни при втором размножении (также называемом быстрым вторым размножением) не содержит сыворотки. Согласно варианту реализации для размножения числа TIL не используют больше одного типа клеточной культуральной среды. Для применения походит любая подходящая клеточная культуральная среда, *например,* клеточная культуральная среда AIM-V (L-глутамин, 50 мкМ сульфат стрептомицина и 10 мкМ

сульфат гентамицина) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В этом отношении способы согласно настоящему изобретению благоприятным образом снижают объем среды и количество типов среды, необходимые для размножения TIL. Согласно варианту реализации размножение числа TIL может включать подкормку клеток не чаще, чем раз в три или четыре дня. Размножение количества клеток в газопроницаемом контейнере упрощает процедуры, необходимые для размножения количества клеток, за счет снижения частоты кормления, необходимой для размножения клеток.

[00954] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры, необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME).

[00955] Согласно варианту реализации продолжительность способа, включающего взятие образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование указанного образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, IX антигенпрезентирующих фидерных клеток, и OKT-3, на протяжении периода, составляющего приблизительно от 1 до 8 дней, *например,* приблизительно 8 дней, в качестве подготовительного первого размножения; перенос указанных TIL во второй газопроницаемый контейнер и размножение TIL в указанном втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3 на протяжении периода, составляющего приблизительно 7-9 дней, *например,* приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней или приблизительно 9 дней.

[00956] Согласно варианту реализации продолжительность способа, включающего взятие образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование указанного образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, IX антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, на протяжении периода, составляющего приблизительно от 1 до 7 дней, *например,* приблизительно 7 дней, в качестве подготовительного первого размножения; перенос указанных TIL во второй газопроницаемый контейнер и размножение TIL в указанном втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, на протяжении периода, составляющего приблизительно 7-9 дней, *например,* приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней или приблизительно 9 дней.

[00957] Согласно варианту реализации продолжительность способа, включающего взятие образца опухолевой ткани у млекопитающего; культивирование указанного образца опухолевой ткани в первом газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, IX антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3, на протяжении периода, составляющего приблизительно от 1 до 7 дней, *например,* приблизительно 7 дней в качестве подготовительного первого размножения; перенос

указанных TIL во второй газопроницаемый контейнер и размножение TIL в указанном втором газопроницаемом контейнере, содержащем клеточную среду, включающую ИЛ-2, 2X антигенпрезентирующих фидерных клеток и OKT-3 на протяжении периода, составляющего приблизительно 7-10 дней, *например,* приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней или приблизительно 10 дней.

[00958] Согласно варианту реализации TIL размножают в газопроницаемых контейнерах. Газопроницаемые контейнеры использовались для размножения TIL с использованием МКПК с применением способов, композиций и устройств, известных в данной области техники, в том числе описанных в опубликованной заявке на патент США 2005/0106717 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно варианту реализации TIL размножают в газопроницаемых пакетах. Согласно варианту реализации TIL размножают с использованием системы размножения клеток, в которой TIL размножают в газопроницаемых пакетах, такой как Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare). Согласно варианту реализации TIL размножают с использованием системы размножения клеток, в которой TIL размножают в газопроницаемых пакетах, такой как WAVE Bioreactor System, также известной как Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare). Согласно варианту реализации указанная система размножения клеток включает газопроницаемый пакет для клеток с объемом, выбранным из группы, состоящей из приблизительно 100 мл, приблизительно 200 мл, приблизительно 300 мл, приблизительно 400 мл, приблизительно 500 мл, приблизительно 600 мл, приблизительно 700 мл, приблизительно 800 мл, приблизительно 900 мл, приблизительно 1 л, приблизительно 2 л, приблизительно 3 л, приблизительно 4 л, приблизительно 5 л, приблизительно 6 л, приблизительно 7 л, приблизительно 8 л, приблизительно 9 л и приблизительно 10 л.

[00959] Согласно варианту реализации TIL могут быть размножены во флаконах G-Rex (коммерчески доступных от Wilson Wolf Manufacturing). Такие варианты реализации позволяют размножать популяции клеток от приблизительно 5×10^5 клеток/см^2 до 10×10^6-30×10^6 клеток/см^2. Согласно варианту реализации указанное размножение происходит без подкормки. Согласно варианту реализации указанное размножение происходит без подкормки при условии, что среда во флаконах G-Rex доходит до высоты, равной примерно 10 см. Согласно варианту реализации указанное размножение происходит без подкормки, но с добавлением одного или нескольких цитокинов. Согласно варианту реализации указанный цитокин может быть добавлен в виде болюса без необходимости перемешивания указанного цитокина со средой. Такие контейнеры, устройства и способы известны в данной области техники и применялись для размножения TIL, и включают описанные в опубликованной заявке на патент США US 2014/0377739A1, международной публикации № WO 2014/210036 A1, опубликованной заявке на патент США № US 2013/0115617 A1, международной публикации № WO 2013/188427 A1, опубликованной заявке на патент США US 2011/0136228 A1, патенте США US 8809050 B2, международной публикации № WO 2011/072088 A2,

опубликованной заявке на патент США US 2016/0208216 A1, опубликованной заявке на патент США US 2012/0244133 A1, международной публикации № WO 2012/129201 A1, опубликованной заявке на патент США US 2013/0102075 A1, патенте США US 8956860 B2, международной публикации № WO 2013/173835 A1, опубликованной заявке на патент США US 2015/0175966 A1, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие процессы также описаны в источнике: Jin et al., J. Immunotherapy, **2012**, 35:283-292.

Необязательное генетическое конструирование TIL

[00960] Согласно некоторым вариантам реализации с размноженными TIL согласно настоящему изобретению проводят дополнительные манипуляции до, во время или после этапа размножения, в том числе в ходе закрытых стерильных процессов изготовления, согласно описанию каждого из них в настоящем документе, для временного изменения экспрессии белка. Согласно некоторым вариантам реализации ременное изменение экспрессии белка обусловлено временным редактированием генов. Согласно некоторым вариантам реализации размноженные TIL согласно настоящему изобретению обрабатывают транскрипционными факторами (TF) и/или другими молекулами, способные временно изменять экспрессию белков в TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TF и/или другие молекулы, способные временно изменять экспрессию белков, обеспечивают измерение экспрессии опухолевых антигенов и/или изменение количества специфических в отношении опухолевых антигенов Т-клеток в популяции TIL.

[00961] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает генетическое редактирование популяции TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает генетическое редактирование первой популяции TIL, второй популяции TIL и/или третьей популяции TIL.

[00962] Согласно некоторым вариантам реализации настоящим изобретением предусмотрено генетическое редактирование путем инсерции нуклеотидов, например, инсерции рибонуклеиновой кислоты (РНК), в том числе инсерции матричной РНК (мРНК) или малой (или короткой) интерферирующей РНК (миРНК), в популяцию TIL для стимуляции экспрессии одного или более белков или ингибирования экспрессии одного или более белков, а также комбинации одновременно стимуляции одного набора белков и ингибирования другого набора белков.

[00963] Согласно некоторым вариантам реализации в размноженных TIL согласно настоящему изобретению происходит временное изменение экспрессии белка. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит в смешанной популяции TIL до первого размножения, в том числе, например, в популяции TIL, полученной, например, на этапе A, как показано на фиг. 1 (в частности фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит во время первого размножения, в том числе, например, в популяции TIL, размноженной, например, на этапе B, как показано на фиг. 1

(например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит после первого размножения, в том числе, например, в популяции TIL при переходе от первого к второму размножению (*например*, второй популяции TIL согласно описанию в настоящем документе), в популяции TIL, полученной, например, на этапе B и включенной в этап C, как показано на фиг. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит в смешанной популяции TIL до второго размножения, в том числе, например, в популяции TIL, полученной, например, на этапе C и до ее размножения на этапе D, как показано на фиг. 1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит в ходе второго размножения, в том числе, например, в популяции TIL, размноженной, например, на этапе D, как показано на фиг. 1 (*например*, в третьей популяции TIL). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка происходит после второго размножения, в том числе, например, в популяции TIL, полученной путем размножения, например, на этапе D, как показано на фиг. 1.

[00964] Согласно варианту реализации способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап электропорации. Способы электропорации известны в данной области техники и описаны, *например,* в источниках: Tsong, Biophys. J. **1991,** 60, 297-306 и опубликованная заявка на патент США № 2014/0227237 A1, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает стадию трансфекции фосфатом кальция. (Изменено)Восстановить исходный вариант Способы трансфекции фосфатом кальция (осаждение ДНК фосфатом кальция, покрытие поверхности клеток и эндоцитоз) известны в данной области техники и описаны в источниках: Graham и van der Eb, Virology **1973,** 52, 456-467; Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. **1979,** 76, 1373-1376; Chen и Okayarea, Mol. Cell. Biol. **1987,** 7, 2745-2752; и в патенте США № 5593875, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап липосомальной трансфекции. Способы липосомальной трансфекции, такие как способы, для которых используется липосомальный состав с 1:1 (по массе) катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-n, n,n-триметилхлорида аммония (DOTMA) и диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в профильтрованной воде, известны в данной области техники и описаны в источниках: 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, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ временного изменения экспрессии белка в популяции TIL включает этап трансфекции с применением способов, описанных в патентах США № 5766902; № 6025337; № 6410517; № 6475994; и № 7189705; содержание каждого из

которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[00965] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к увеличению количества стволовых Т-клеток памяти (TSCM). TSCM являются ранними предшественниками Т-клеток центральной памяти, контактировавших с антигеном. TSCM, в целом, демонстрируют долгосрочное выживание, самообновление и мультипотентность, которой характеризуются стволовые клетки, и, как правило, благоприятны для создания эффективных продуктов TIL. TSCM продемонстрировали повышенную противоопухолевую активность по сравнению с другими подгруппами Т-клеток в моделях адоптивного переноса клеток на мышах (Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011; Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012; Cieri et al. Blood 2013). Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к получению популяции TIL с высоким содержанием TSCM. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит по меньшей мере к 5%, по меньшей мере к 10%, по меньшей мере к 10%, по меньшей мере к 20%, по меньшей мере к 25%, по меньшей мере к 30%, по меньшей мере к 35%, по меньшей мере к 40%, по меньшей мере к 45%, по меньшей мере к 50%, по меньшей мере к 55%, по меньшей мере к 60%, по меньшей мере к 65%, по меньшей мере к 70%, по меньшей мере к 75%, по меньшей мере к 80%, по меньшей мере к 85%, по меньшей мере к 90% или по меньшей мере к 95% повышению процента TSCM. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к по меньшей мере 1-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному или 10-кратному увеличению количества TSCM в популяции TIL. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к получению популяции TIL, содержащей по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% TSCM. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к а терапевтическая популяция TIL, содержащей по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% TSCM.

[00966] В некоторых вариантах реализации временное изменение экспрессии белка приводит к обновлению Т-клеток, контактировавших с антигеном. Согласно некоторым вариантам реализации обновление включает, например, повышенную пролиферацию, повышенную активацию Т-клеток и/или повышенное распознавание антигена.

[00967] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка изменяет экспрессию в значительной части Т-клеток, чтобы сохранить происходящий из опухоли репертуар TCR. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка не изменяет происходящий из опухоли репертуар TCR. Согласно некоторым вариантам реализации при временном изменении экспрессии белка сохраняется происходящий из опухоли репертуар TCR.

[00968] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к изменению экспрессии конкретного гена. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ген, включающий, не ограничиваясь перечисленными, PD-1 (также называемый PDCD1 или CC279), TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, ТФР-β, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимую протеинкиназу A (PKA). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, TGFBR2, CCR4/5, CBLB (CBL-B), CISH, CCR (химерные костимулирующие рецепторы), ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15, ИЛ-21, NOTCH 1/2 ICD, TIM3, LAG3, TIGIT, ТФР-β, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2, CSCR3, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1/CXCL8, CCL22, CCL17, CXCL1/CXCL8, VHL, CD44, PIK3CD, SOCS1 и/или цАМФ-зависимой протеинкиназы A (PKA). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на TGFBR2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR4/5. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CISH. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR (химерные костимулирующие рецепторы). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ИЛ-12. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на NOTCH 1/2 ICD. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на TIM3. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на LAG3. Согласно некоторым вариантам

реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на TIGIT. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на ТФР-β. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR4. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCR5. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCR1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCR2. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CSCR3. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL2 (MCP-1). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL3 (MIP-1α). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL4 (MIP1-β). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL5 (RANTES). Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCL1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CXCL8. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL22. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CCL17. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на VHL. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на CD44. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на PIK3CD. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на SOCS1. Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка нацелено на цАМФ-зависимую протеинкиназу А (PKA).

[00969] Согласно некоторым вариантам реализации указанное временное изменение экспрессии белка приводит к повышенной и/или избыточной экспрессии хемокинового рецептора. Согласно некоторым вариантам реализации хемокиновый рецептор, который избыточно экспрессируется за счет временной экспрессии белка, включает рецептор с лигандом, который включает, не ограничиваясь перечисленными, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP1-β), CCL5 (RANTES), CXCL1, CXCL8, CCL22, и/или CCL17.

[00970] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению количества и/или снижению экспрессии PD-1,

CTLA-4, TIM-3, LAG-3, TIGIT, TGFβR2 и/или ТФР-β (что приводит, в том числе, например, к блокаде пути ТФР-β). Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению количества и/или снижению экспрессии CBLB (CBL-B). Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению количества и/или снижению экспрессии CISH.

[00971] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии хемокиновых рецепторов для, например, улучшения транспортировки или перемещения TIL в сайт опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии CCR (химерного костимулирующего рецептора). Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии хемокинового рецептора, выбранного из группы, состоящей из CCR1, CCR2, CCR4, CCR5, CXCR1, CXCR2 и/или CSCR3.

[00972] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии интерлейкина. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии интерлейкина, выбранного из группы, состоящей из ИЛ-2, ИЛ-12, ИЛ-15 и/или ИЛ-21.

[00973] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии NOTCH 1/2 ICD. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии VHL. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии CD44. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии PIK3CD. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к повышению уровня и/или избыточной экспрессии SOCS1,

[00974] Согласно некоторым вариантам реализации указанный временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии цАМФ-зависимой протеинкиназы A (PKA).

[00975] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии двух молекул, выбранных из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно

некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1 и одной молекулы, выбранной из группы, состоящей из LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1, LAG-3, CISH, CBLB, TIM3, и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1 и одного из LAG3, CISH, CBLB, TIM3, и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1 и LAG3. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1 и CISH. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии PD-1 и CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии LAG3 и CISH. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии LAG3 и CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии CISH и CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии TIM3 и PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии TIM3 и LAG3. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии TIM3 и CISH. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии TIM3 и CBLB.

[00976] Согласно некоторым вариантам реализации молекулу адгезии, выбранную из группы, состоящей из CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций, инсертируют способом с применением гаммаретровируса или лентивируса в первую популяцию TIL, вторую популяцию TIL или собранную популяцию TIL (*например*, экспрессия указанной молекулы адгезии повышается).

[00977] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3) и их комбинаций, и повышению и/или усилению экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка приводит к уменьшению и/или снижению экспрессии молекулы, выбранной из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CISH, CBLB и их комбинаций, и повышению и/или усилению экспрессии CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1 и их комбинаций.

[00978] Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 90%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 99%.

[00979] Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам

реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 90%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 99%.

[00980] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка индуцируют обработкой TIL транскрипционными факторами (TF) и/или другими молекулами, способными временно изменять экспрессию белков в TIL. Согласно некоторым вариантам реализации используют безвекторную микрофлюидную платформу SQZ для внутриклеточной доставки транскрипционных факторов (TF) и/или других молекул, способных временно изменять экспрессию белка. Были описаны такие способы, демонстрирующие способность доставлять белки, включая транскрипционные факторы, в разнообразные первичные клетки человека, включая Т-клетки (Sharei et al. PNAS 2013, а также Sharei et al. PLOS ONE 2015 и Greisbeck et al. J. Immunology vol.195, 2015) ; см., например, международные патентные публикации WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1и WO 2017/123663A1, все из которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылки. Такие способы, как описанные в международных патентных публикациях WO 2013/059343A1, WO 2017/008063A1, и WO 2017/123663A1, могут быть использованы для целей настоящего изобретения, чтобы подвергнуть популяцию TIL воздействию транскрипционных факторов (TF) и/или других молекул, способных индуцировать временную экспрессию белка, причем указанные TF и/или другие молекулы, способные индуцировать временную экспрессию белка, обеспечивают повышенную экспрессию опухолевых антигенов и/или увеличение количества опухолевых антиген-специфических Т-клеток в популяции TIL, что приводит к перепрограммированию популяции TIL и увеличению терапевтической эффективности перепрограммированной популяции TIL по сравнению с неперепрограммированной популяцией TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанный перепрограммирование приводит к увеличению субпопуляции эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти относительно стартовой или предыдущей популяции (*т.е.* популяции до перепрограммирования) TIL, согласно описанию в настоящем документе.

[00981] Согласно некоторым вариантам реализации указанный транскрипционный фактор (TF) включает, не ограничиваясь перечисленными TCF-1, NOTCH 1/2 ICD и/или MYB. Согласно некоторым вариантам реализации указанный транскрипционный фактор (TF) представляет собой TCF-1. Согласно некоторым вариантам реализации указанный

транскрипционный фактор (TF) представляет собой NOTCH 1/2 ICD. Согласно некоторым вариантам реализации указанный транскрипционный фактор (TF) представляет собой MYB. Согласно некоторым вариантам реализации указанный транскрипционный фактор (TF) вводят с культурой индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), например, с коммерчески доступным заменителем сыворотки KNOCKOUT (Gibco/ThermoFisher), для индукции перепрограммирования TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанный транскрипционный фактор (TF) вводят с коктейлем иПСК, чтобы индуцировать дополнительное перепрограммирование TIL. Согласно некоторым вариантам реализации транскрипционный фактор (TF) вводят без коктейля иПСК. Согласно некоторым вариантам реализации перепрограммирование приводит к повышению процента TSCM. Согласно некоторым вариантам реализации перепрограммирование приводит к повышению процента TSCM приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, на приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90% или приблизительно на 95% TSCM.

[00982] Согласно некоторым вариантам реализации способ временного изменения экспрессии белка, согласно описанию выше, может быть скомбинирован со способом генетической модификации популяции TIL, который включает этап стабильного встраивания генов для продуцирования одного или более белков. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает этап генетической модификации популяции TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает генетическую модификацию первой популяции TIL, второй популяции TIL и/или третьей популяции TIL. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап ретровирусной трансдукции. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области и описаны, *например*, в источниках: 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, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап гамма-ретровирусной трансдукции. Системы гамма-ретровирусной трансдукции известны в данной области техники и описаны, *например,* в источнике: Cepko и Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. **1996,** 9.9.1-9.9.16, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап транспозон-опосредованного генного переноса. Системы транспозон-опосредованного переноса генов известны в данной области техники и включают системы, отличающиеся тем, что

транспозаза представлена в виде экспрессионного ДНК-вектора или экспрессируемой РНК или белка, так что долговременная экспрессия указанной транспозазы в трансгенных клетках не происходит, например, транспозаза представлена в виде мРНК (*например*, мРНК, содержащей кэп и поли-А-«хвост»). Подходящие системы транспозон-опосредованного переноса генов, в том числе Tel-подобная транспозаза типа транспозаз лососевых (транспозаза SB, или «Sleeping Beauty»), такая как SB10, SB11 и SB100x, и сконструированные ферменты с повышенной ферментативной активностью, описаны, *например,* в источниках: Hackett, et al., Mol. Therapy **2010,** 18, 674-83 и патент США № 6489458, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[00983] Согласно некоторым вариантам реализации временное изменение экспрессии белка представляет собой снижение экспрессии, индуцированное самодоставляющейся РНК-интерференцией (сдРНК), которая представляет собой химически синтезированный асимметричный дуплекс миРНК с высоким процентом 2'-OH-замещений (как правило, фтора или -OCH_3), который содержит 20-нуклеотидную антисмысловую (направляющую) цепь и содержащую 13-15 оснований смысловую (сопровождающую) цепь, конъюгированные с холестерином на 3'-конце с применением тетраэтилэнгликолевого (ТЭГ) линкера. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает временное изменение экспрессии белка в популяции TIL, включающее применение самодоставляющейся РНК-интерференции (сдРНК), которая представляет собой химически синтезированный асимметричный дуплекс миРНК с высоким процентом 2'-OH-замещений (как правило, фтор или -OCH_3), который содержит 20-нуклеотидную антисмысловую (направляющую) цепь и и содержащую 13-15 оснований смысловую (сопровождающую) цепь, конъюгированные с холестерином на 3'-конце с применением тетраэтилэнгликолевого (ТЭГ) линкера. Способы применения сдРНК были описаны в источниках: Khvorova и Watts, Nat. Biotechnol. **2017,** 35, 238-248; Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. **2013,** 29, 855-864; и Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, **2018,** в печати, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации доставку сдРНК в популяцию TIL осуществляют без применения электропорации, SQZ или других способов, вместо этого используют 1-3-дневный период, в течение которого на популяцию TIL воздействуют сдРНК в концентрации 1 мкМ/10000 TIL в среде. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает доставку сдРНК в популяцию TIL, включающий воздействие на указанную популяцию TIL сдРНК в концентрации 1 мкМ/10000 TIL в среде на протяжении периода, составляющего от 1 до 3 дней. Согласно варианту реализации доставку сдРНК в популяцию TIL осуществляют с использованием 1-3-дневного периода, в течение которого на популяцию TIL воздействуют сдРНК в концентрации 10 мкМ/10000 TIL в среде. Согласно варианту реализации доставку сдРНК в популяцию TIL осуществляют с использованием 1-3-дневного периода, в течение которого на популяцию TIL воздействуют сдРНК в концентрации 50 мкМ/10000 TIL в

среде. Согласно варианту реализации доставку сдРНК в популяцию TIL осуществляют с использованием 1-3-дневного периода, в течение которого на популяцию TIL воздействуют сдРНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 TIL до 50 мкМ/10000 TIL в среде. Согласно варианту реализации доставку сдРНК в популяцию TIL осуществляют с использованием 1-3-дневного периода, в течение которого на популяцию TIL воздействуют сдРНК в концентрации от 0,1 мкМ/10000 TIL до 50 мкМ/10000 TIL в среде, причем указанное воздействие сдРНК осуществляют два, три, четыре или пять раз путем добавления свежей сдРНК в среду. Другие подходящие процессы описаны, например, в опубликованных заявках на патент США US 2011/0039914 A1, US 2013/0131141 A1, и US 2013/0131142 A1, и в патенте США № 9080171, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[00984] Согласно некоторым вариантам реализации сдРНК инсертируют в популяцию TIL при получении. Согласно некоторым вариантам реализации сдРНК кодирует РНК, взаимодействующую с NOTCH 1/2 ICD, PD-1, CTLA-4 TIM-3, LAG-3, TIGIT, ТФР-β, TGFBR2, цАМФ-зависимой протеинкиназой A (PKA), BAFF BR3, CISH и/или CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации снижение экспрессии определяют на основании процента сайленсинга экспрессии генов, например, оцениваемого с помощью проточной цитометрии и/или кПЦР. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии приблизительно на 5%, приблизительно на 10%, приблизительно на 10%, приблизительно на 20%, приблизительно на 25%, приблизительно на 30%, приблизительно на 35%, приблизительно на 40%, приблизительно на 45%, приблизительно на 50%, приблизительно на 55%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90% или приблизительно на 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, приблизительно 90% или приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 80%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 85%, Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 90%.

Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации происходит снижение экспрессии, составляющее по меньшей мере приблизительно 99%.

[00985] Технология самодоставляемых РНКи, основанная на химической модификации миРНК, может использоваться в способах согласно настоящему изобретению для успешной доставки сдРНК в TIL согласно описанию в настоящем документе. Комбинация модификаций остова с асимметричной структурой миРНК и гидрофобным лигандом (см., *например*, Ligtenberg, et al., Mol. Therapy, **2018** и US20160304873) позволяет сдРНК проникать в культивируемые клетки млекопитающих без использования дополнительных составов и способов просто при добавлении в культуральную среду, пользуясь устойчивостью сдРНК к нуклеазам. указанная стабильность позволяет поддерживать постоянные уровни РНКи-опосредованного снижения активности целевого гена просто за счет поддержания активной концентрации сдРНК в среде. Без ограничения какой-либо теорией, стабилизация остова сдРНК обеспечивает длительный эффект снижения экспрессии генов, который может месяцами сохраняться в неделящихся клетках.

[00986] Согласно некоторым вариантам реализации наблюдается эффективность трансфекции TIL более 95% и снижение экспрессии мишени под действием различных конкретных сдРНК. Согласно некоторым вариантам реализации сдРНК, содержащие несколько немодифицированных остатков рибозы, были заменены полностью модифицированными последовательностями для повышения эффективности и/или продолжительности действия РНК-интерференции. Согласно некоторым вариантам реализации эффект снижения экспрессии сохраняется в течение 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 5 дней, 6 дней, 7 дней или 8 дней, или дольше. Согласно некоторым вариантам реализации эффект снижения экспрессии уменьшается через 10 дней или более после обработки TIL сдРНК. Согласно некоторым вариантам реализации сохраняется более чем 70% снижение экспрессии мишени. Согласно некоторым вариантам реализации сохраняется более чем 70% снижение экспрессии мишени вTIL. Согласно некоторым вариантам реализации снижение экспрессии в пути PD-1/PD-L1 позволяет TIL демонстрировать более мощный эффект in vivo, что обусловлено, согласно некоторым вариантам реализации, избеганием супрессивных эффектов пути PD-1/PD-L1. Согласно некоторым вариантам реализации снижение экспрессии PD-1 за счет сдРНК приводит к повышению пролиферации TIL.

[00987] Малая интерферирующая РНК (миРНК), иногда называемая короткой интерферирующей РНК или сайленсинговой РНК, представляет собой двухцепочечную молекулу РНК, длиной, как правило, 19-25 пар оснований. миРНК используется при РНК-интерференции (РНК-интерференция), где она вмешивается в экспрессию конкретных генов с комплементарными последовательностями нуклеотидов.

[00988] Двухцепочечная ДНК (дцРНК), как правило, может быть использована для

определения любой молекулы, содержащей пару комплементарных цепей РНК, обычно смысловую (сопровождающую) и антисмысловую (направляющую) цепи, и может включать одноцепочечные «липкие» области. Термин дцРНК, в отличие от миРНК, обычно относится к молекуле-предшественнику, которая включает последовательность молекулы миРНК, высвобождаемая из большей молекулы дцРНК под действием систем ферментативного расщепления, в том числе Dicer.

[00989] сдРНК (самодоставляющаяся РНК) представляет собой новый класс ковалентно модифицированных РНКи-соединений, которые не нуждаются в носителе для доставки, чтобы проникать в клетки, и имеют улучшенные фармакологические характеристики по сравнению с традиционными миРНК. «Самодоставляющаяся РНК» или «сдРНК» представляет собой гидрофобно модифицированный РНК-интерферирующий/антисмысловой гибрид, продемонстрировавший высокую эффективность in vitro в первичных клетках и in vivo при местном введении. Было продемонстрировано устойчивое поглощение и/или сайленсинг без токсичности. сдРНК, как правило, представляют собой асимметричные химически модифицированные молекулы нуклеиновой кислоты с минимальными двухцепочечными областями. Молекулы сдРНК обычно содержат одноцепочечные области и двухцепочечные области, и могут содержать разнообразные химические модификации как в одноцепочечных, так и в двухцепочечных областях молекулы. Кроме того, молекулы сдРНК могут быть присоединены к гидрофобному конъюгату, такому как обычная и усовершенствованная молекула стеринового типа, согласно описанию в настоящем документе. сдРНК и соответствующие способы получения таких сдРНК также были подробно описаны, например, в US 20160304873, WO2010033246, WO2017070151, WO2009102427, WO2011119887, WO2010033247A2, WO2009045457, WO2011119852, каждый из которых полностью и для любых целей включен посредством ссылки в настоящий документ. Для оптимизации структуры, химических свойств сдРНК, положения для нацеливания, предпочтительной последовательности и т.п. был разработан специальный алгоритм, который используется для прогнозирования активности сдРНК (*см., например*, US 20160304873). На основании этих анализов функциональные последовательности сдРНК были определены как обеспечивающие более 70% снижение экспрессии при концентрации 1 мкМ с вероятностью более 40%.

[00990] Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 70% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 75% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 80% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 85% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам

реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 90% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 95% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют 99% снижение экспрессии целевого гена. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации от приблизительно 0,25 мкМ до приблизительно 4 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 0,25 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 0,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 0,75 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 1,0 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 1,25 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 1,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 1,75 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 2,0 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 2,25 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 2,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 2,75 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые

согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 3,0 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 3,25 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 3,5 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 3,75 мкМ. Согласно некоторым вариантам реализации последовательности сдРНК, используемые согласно настоящему изобретению, демонстрируют снижение экспрессии целевого гена при доставке в концентрации приблизительно 4,0 мкМ.

[00991] Согласно некоторым вариантам реализации олигонуклеотидные агенты содержат одну или более модификаций для повышения стабильности и/или эффективности терапевтического агента, и для обеспечения эффективной доставки указанного олигонуклеотида в клетки или в ткань, подлежащие лечению. Такие модификации могут включать 2'-O-метильную модификацию, 2'-O-фтор-модификацию, дифосфотиоатную модификацию, 2'-F-модифицированный нуклеотид, 2'-O-метил-модифицированный и/или 2'-дезоксинуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации указанный олигонуклеотид модифицирован так, чтобы включать одну или более гидрофобных модификаций, включая, например, стерол, холестерин, витамин D, нафтил, изобутил, бензил, индол, триптофан и/или фенил. Согласно дополнительному конкретному варианту реализации химически модифицированные нуклеотиды представляют собой комбинацию фосфотиоатов, 2'-O-метильных, 2'дезокси-, гидрофобных модификаций и фосфотиоатов. Согласно некоторым вариантам реализации сахара могут быть модифицированы, и модифицированный сахар может включать, не ограничиваясь перечисленными, D-рибозу, 2'-O-алкил (в том числе 2'-O-метил и 2'-O-этил), т.е. 2'-алкокси, 2'-амино, 2'-S-алкил, 2'-галоген (в том числе 2'-фтор), T-метоксиэтокси, 2'-аллилокси (-OCH2CH=CH2), 2'-пропаргил, 2'-пропил, этинил, этенил, пропенил, цианогруппу и т.п. Согласно одному варианту реализации фрагмент сахара может представлять собой гексозу и быть включен в олигонуклеотид согласно существующему описанию (в источнике: Augustyns, K., et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)).

[00992] Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению является двухцепочечным по всей длине, т.е. без «липкой» одноцепочечной последовательности на каком-либо из концов молекулы, *т.е*. указанная молекула имеет «тупые» концы. Согласно некоторым вариантам реализации индивидуальные молекулы нуклеиновой кислоты могут иметь разную длину. Другими словами, двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению не

является двухцепочечным по всей длине. Например, если используют две отдельные молекулы нуклеиновой кислоты, одна из указанных молекул, *например*, первая молекула, содержащая антисмысловую последовательность, может быть длиннее, чем вторая молекула, гибридизирующаяся с ней (при этом часть молекулы остается одноцепочечной). Согласно некоторым вариантам реализации, если используют одну молекула нуклеиновой кислоты, часть молекулы на любом ее конце может оставаться одноцепочечной.

[00993] Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению содержит некомплементарные основания и/или петли или выпетливания, однако является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере 70% длины указанного олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере приблизительно 80% длины указанного олигонуклеотида. Согласно другому варианту реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере приблизительно 90%-95% длины указанного олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению является двухцепочечным на протяжении по меньшей мере приблизительно 96%-98% длины указанного олигонуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации двухцепочечный олигонуклеотид согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере или до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 некомплементарных оснований.

[00994] Согласно некоторым вариантам реализации указанный олигонуклеотид может быть по существу защищен от нуклеаз, *например,* путем модификации 3' или 5'-связей (см., *например,* патент США № 5849902 и WO 98/13526). Например, олигонуклеотидам можно придать устойчивость путем включения «блокирующей группы». Термин «блокирующая группа» в настоящем документе относится к заместителям (например, не ОН-группам), которые могут быть присоединены к олигонуклеотидам или нуклеомономерам, либо в качестве защитных групп, либо в качестве связывающих групп для синтеза (*например*, ФИТЦ, пропил ($(CH_2-CH_2-CH_3)$), гликоль ($-O-CH_2-CH_2-O-$) фосфат ($PO_3^{2"}$), гидрофосфонат или фосфорамидит). «Блокирующие группы» могут также включать «концевые блокирующие группы» или «блокирующие экзонуклеазы группы», которые защищают 5' и 3' концы олигонуклеотида, в том числе модифицированные нуклеотиды и структуры, устойчивые к ненуклеотидным экзонуклеазам.

[00995] Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере часть смежных полинуклеотидов в сдРНК соединена замещающей связью, *например*, фосфотиоатной связью.

[00996] Согласно некоторым вариантам реализации химическая модификация может приводить к по меньшей мере к 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45,

50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 улучшений клеточного поглощения. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере один из остатков C или U содержит гидрофобную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации множество C и U содержат гидрофобную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60% 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или по меньшей мере 95% C и U могут содержать гидрофобную модификацию. Согласно некоторым вариантам реализации все C и U содержат гидрофобную модификацию.

[00997] Согласно некоторым вариантам реализации указанная сдРНК, или sd-rxRNA демонстрируют повышенное эндосомное высвобождение молекул sd-rxRNA за счет включения протонируемых аминов. Согласно некоторым вариантам реализации протонируемые амины включены в смысловую цепь (в часть молекулы, которая отбрасывается после загрузки в RISC). Согласно некоторым вариантам реализации соединения сдРНК согласно настоящему изобретению содержат асимметричное соединение, содержащее дуплексную область (необходимую для эффективного входа в RISC, длиной 10-15 оснований) и одноцепочечную область длиной 4-12 нуклеотидов; с дуплексом из 13 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации используют одноцепочечную область из 6 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации указанный одноцепочечная область сдРНК содержит 2-12 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей (называемых фосфоротиоатными модификациями). Согласно некоторым вариантам реализации используются 6-8 фосфоротиоатных межнуклеотидных связей. Согласно некоторым вариантам реализации соединения сдРНК согласно настоящему изобретению также включают уникальный паттерн химической модификации, который обеспечивает стабильность и совместим с входом в RISC.

[00998] Направляющая цепь, например, также может быть модифицирована путем любой химической модификации, которая поддерживает стабильность, не препятствуя входу в RISC. Согласно некоторым вариантам реализации паттерн химической модификации в направляющей цепи включает большинство 2'-F-модифицированных нуклеотидов C и U, а 5'-конец фосфорилирован.

[00999] Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере 30% нуклеотидов в сдРНК или sd-rxRNA модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации по меньшей мере 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидов в сдРНК или sd-rxRNA модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации 100% нуклеотидов в сдРНК или sd-rxRNA модифицированы.

[001000] Согласно некоторым вариантам реализации молекулы сдРНК содержат

минимальные двухцепочечные области. Согласно некоторым вариантам реализации область указанной молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину от 8 до 15 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации область указанной молекулы, которая является двухцепочечной, имеет длину 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации длина двухцепочечной области составляет 13 нуклеотидов. Направляющая и сопровождающая цепи могут быть на 100% комплементарны, либо в направляющей и сопровождающей цепях могут присутствовать один или несколько некомплементарных оснований. Согласно некоторым вариантам реализации с одного конца двухцепочечной молекулы находится либо «тупой» конец, либо однонуклеотидный «липкий» выступ. Одноцепочечная область молекулы согласно некоторым вариантам реализации имеет длину от 4 до 12 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации одноцепочечная область может иметь длину 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации одноцепочечная область также может иметь длину менее 4 или более 12 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации одноцепочечная область имеет длину 6-7 нуклеотидов.

[001001] Согласно некоторым вариантам реализации указанные молекулы сдРНК имеют повышенную стабильность. В некоторых случаях химически модифицированная молекула сдРНК или sd-rxRNA имеет период полужизни в среде более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более 24 часов, включая любые промежуточные значения. Согласно некоторым вариантам реализации указанная sd-rxRNA имеет период полужизни в среде более 12 часов.

[001002] Согласно некоторым вариантам реализации указанный сдРНК оптимизирована для повышения эффективности и/или снижения токсичности. Согласно некоторым вариантам реализации длина нуклеотида направляющей и/или сопровождающей цепи, и/или количество фосфотиоатных модификаций в направляющей и/или сопровождающей цепи, может, согласно некоторым аспектам, влиять на активность молекулы РНК, тогда как замена 2'-фтор- (2'F) модификаций на 2'-O-метильные (2'OMe) модификации может, согласно некоторым аспектам, влиять на токсичность молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации, как предполагается, уменьшение содержания 2'F в молекуле снижает токсичность указанной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации количество фосфотиоатных модификаций в молекуле РНК может влиять на поглощение указанной молекулы клеткой, например, на эффективность пассивного поглощения молекулы клеткой. В некоторых вариантах реализации сдРНК не содержит 2'F-модификаций и, тем не менее, характеризуется равной эффективностью поглощения клетками и проникновения в ткани.

[001003] Согласно некоторым вариантам реализации направляющая цепь имеет длину примерно 18-19 нуклеотидов и содержит примерно 2-14 фосфатных модификаций. Например, направляющая цепь может содержать 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более 14 нуклеотидов, модифицированных фосфатом. Указанная направляющая цепь может содержать одну или несколько модификаций, которые придают ей повышенную

стабильность, не мешая входу в RISC. Нуклеотиды, модифицированные фосфатом, такие как нуклеотиды, модифицированные фосфотиоатом, могут находиться на 3'-конце, 5'-конце или быть распределены по всей длине направляющей цепи. Согласно некоторым вариантам реализации 10 3'-концевых нуклеотидов направляющей цепи содержат 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модифицированных фосфотиоатами нуклеотидов. Указанная направляющая цепь может также содержать 2'F- и/или 2'OMe-модификации, которые могут быть распределены по всей длине молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации нуклеотид в положении 1 направляющей цепи (последний нуклеотид на 5'-конце направляющей цепи) 2'OMe-модифицирован и/или фосфорилирован. Нуклеотиды C и U в направляющей цепи могут быть 2'F-модифицированы. Например, нуклеотиды C и U в положениях 2-10 направляющей цепи из 19 нуклеотидов (или в соответствующих положениях в направляющей цепи другой длины) могут быть 2'F-модифицированы. Нуклеотиды C и U в направляющей цепи также могут быть 2'OMe-модифицированы. Например, нуклеотиды C и U в положениях 11-18 направляющей цепи длиной 19 нуклеотидов (или в соответствующих положениях направляющей цепи другой длины) могут быть 2'OMe-модифицированы. Согласно некоторым вариантам реализации крайний нуклеотид на 3'-конце направляющей цепи не модифицирован. Согласно некоторым вариантам реализации большинство C и U в направляющей цепи 2'F-модифицированы, а 5'-конец направляющей цепи фосфорилирован. Согласно другим вариантам реализации положение 1 и C или U в положениях 11-18 2'OMe-модифицированы, а 5'-конец направляющей цепи фосфорилирован. Согласно другим вариантам реализации положение 1 и C или U в положениях 11-18 2'OMe-модифицированы, 5'-конец направляющей цепи фосфорилирован, а C или U в положениях 2-10 2'F-модифицированы.

[001004] Технология самодоставляемой РНКи обеспечивает способ прямой трансфекции клеток РНКи-агентом без необходимости применения дополнительных составов или методик. Способность трансфицировать трудно трансфицируемые клеточные линии, высокая активность in vivo и простота применения - характеристики указанных композиций и способов, которые обладают значительными функциональными преимуществами по сравнению с традиционными методами на основе миРНК, и поэтому задействующие сдРНК способы используются в нескольких вариантах реализации, относящихся к способам снижения экспрессии целевого гена в TIL согласно настоящему изобретению. Способы, задействующие сдРНКи, позволяют осуществлять прямую доставку химически синтезированных соединений в широкий спектр первичных клеток и тканей, как ex vivo, так и in vivo. сдРНК, описанные для некоторых вариантов реализации настоящего изобретения, коммерчески доступны от Advirna LLC, Вустер, Массачусетс, США.

[001005] сдРНК образуются в виде гидрофобно-модифицированных гибридных структур миРНК-антисмысловой олигонуклеотид и раскрыты, например, в источнике: Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864, полностью включенном в настоящий документ посредством ссылки.

[001006] Согласно некоторым вариантам реализации олигонуклеотиды сдРНК могут быть доставлены в TIL, описанные в настоящем документе, с использованием стерильной электропорации. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает стерильный электропорацию популяции TIL для доставки олигонуклеотидов сдРНК.

[001007] Согласно некоторым вариантам реализации указанные олигонуклеотиды могут быть доставлены в клетки в комбинации с трансмембранной системой доставки. Согласно некоторым вариантам реализации указанная трансмембранная система доставки включает липиды, вирусные векторы и т.п. Согласно некоторым вариантам реализации указанный олигонуклеотидный агент представляет собой самодоставляемый РНКи-агент, который не требует применения каких-либо агентов для доставки. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает применение трансмембранной системы доставки для доставки олигонуклеотидов сдРНК в популяцию TIL.

[001008] Олигонуклеотиды и олигонуклеотидные композиции контактируют с описанными здесь TIL (*например*, их приводят в контакт с TIL, или, как также говорится в настоящем документе, вводят или доставляют в TIL) и поглощаются ими, в том числе путем пассивного поглощения клетками TIL. Указанные сдРНК могут быть добавлены к TIL согласно описанию в настоящем документе во время первого размножения, например, на этапе B, после первого размножения, например, на этапе Этап C, до или во время второго размножения, например до или во время этапа D, после этапа D и до сбора на этапе E, во время или после сбора на этапе F, до или во время получения итогового состава и/или переноса в пакет для инфузии на этапе F, а также до любого необязательного этапа криоконсервации на этапе F. Кроме того, сдРНК могут быть добавлены после размораживания после любого этапа криоконсервации на этапе F. Согласно варианту реализации одна или более сдРНК, нацеленные на гены согласно описанию в настоящем документе, в том числе PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, могут быть добавлены в клеточную культуральную среду, содержащую TIL и другие агенты в концентрациях, выбранных из группы, состоящей из 100 нМ - 20 мМ, 200 нМ - 10 мМ, 500 нм - 1 мМ, 1 мкМ - 100 мкМ, и 1 мкМ - 100 мкМ. Согласно варианту реализации одна или более сдРНК, нацеленные на гены согласно описанию в настоящем документе, в том числе на PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH и CBLB, могут быть добавлены в клеточную культуральную среду, содержащую TIL и другие агенты в количествах, выбранных из группы, состоящей из 0,1 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 0,5 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 0,75 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 1 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 1,25 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 1,5 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 2 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды, 5 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды или 10 мкМ сдРНК/10000 TIL/100 мкл среды. Согласно варианту реализации одна или более сдРНК, нацеленные на гены согласно описанию в настоящем документе, в том числе на PD-1, LAG-3, TIM-3, CISH, и CBLB, могут добавляться в культуры TIL на этапе пре-REP или REP, дважды в день, один раз в день, каждые два дня, каждые три дня,

каждые четыре дня, каждые пять дней, каждые шесть дней или каждые семь дней.

[001009] Композиции олигонуклеотидов согласно настоящему изобретению, в том числе сдРНК, могут быть приведены в контакт с TIL согласно описанию в настоящем документе во время процесса размножения, например, путем растворения сдРНК в высоких концентрациях в клеточной культуральной среде и предоставления достаточного времени для пассивного поглощения. Согласно некоторым вариантам реализации способ согласно настоящему изобретению включает приведение популяции TIL в контакт с композицией олигонуклеотидов согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает растворение олигонуклеотида, *например*, сдРНК, в клеточной культуральной среде и приведение указанной культуральной среды в контакт с популяцией TIL. Указанные TIL могут представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию согласно описанию в настоящем документе.

[001010] Согласно некоторым вариантам реализации доставка олигонуклеотидов в клетки может быть улучшена с помощью известных в данной области техники способов, включающих применение фосфата кальция, ДМСО, глицерина или декстрана, электропорацию, или трансфекцию, *например,* с применением катионных, анионных или нейтральных липидных композиций или липосом, с применением способов, известных в данной области техники (*см., например,* WO 90/14074; WO 91/16024; WO 91/17424; патент США № 4897355; Bergan et a 1993. Nucleic Acids Research. 21:3567).

[001011] Согласно некоторым вариантам реализации для снижения экспрессии целевого гена применяют более одной сдРНК. Согласно некоторым вариантам реализации вместе используют одну или более из нацеленных на PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH сдРНК. Согласно некоторым вариантам реализации PD-1 сдРНК применяют вместе с одной или более из TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH сдРНК для снижения экспрессии более одного гена-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации a LAG3 сдРНК применяют в комбинации с нацеленной на CISH сдРНК для снижения генной экспрессии обеих мишеней. Согласно некоторым вариантам реализации указанные сдРНК, нацеленные на один или более ген из PD-1, TIM-3, CBLB, LAG3 и/или CISH согласно описанию в настоящем документе, коммерчески доступны от Advirna LLC, Вустер, Массачусетс, США.

[001012] Согласно некоторым вариантам реализации указанная сдРНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации указанная сдРНК нацелена на ген, выбранный из группы, состоящей из PD-1, LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на PD-1 и другой сдРНК нацелена на ген выбранный из группы, состоящей из LAG3, TIM3, CTLA-4, TIGIT, CISH, TGFβR2, PKA, CBLB, BAFF (BR3), и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации указанная сдРНК нацелена на ген, выбранный из PD-1, LAG-3,

CISH, CBLB, TIM3, и их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации указанная сдРНК нацелена на ген, выбранный из PD-1 и одного из LAG3, CISH, CBLB, TIM3, а также их комбинаций. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на PD-1, и одна сдРНК нацелена на LAG3. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на PD-1, и одна сдРНК нацелена на CISH. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на PD-1, и одна сдРНК нацелена на CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на LAG3, и одна сдРНК нацелена на CISH. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на LAG3, и одна сдРНК нацелена на CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на CISH, и одна сдРНК нацелена на CBLB. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на TIM3, и одна сдРНК нацелена на PD-1. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на TIM3, и одна сдРНК нацелена на LAG3. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на TIM3, и одна сдРНК нацелена на CISH. Согласно некоторым вариантам реализации одна сдРНК нацелена на TIM3, и одна сдРНК нацелена на CBLB.

[001013] Согласно обсуждению выше, варианты реализации настоящего изобретения обеспечивают инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL), которые были генетически модифицированы посредством редактирования генов для усиления их терапевтического эффекта. Варианты реализации настоящего изобретения включают генетическое редактирование путем инсерции нуклеотидов (РНК или ДНК) в популяцию TIL как для стимуляции экспрессии одного или более белков, так и для ингибирования экспрессии одного или более белков, а также комбинаций перечисленного. Варианты реализации настоящего изобретения также обеспечивают способы размножения TIL в терапевтическую популяцию, причем указанные способы включают редактирование генов TIL. Существует ряд технологий редактирования генов, подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением, которые можно использовать для генетической модификации популяции TIL.

[001014] Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает способ генетической модификации популяции TIL, который включает этап стабильного встраивания генов для продуцирования одного или более белков. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап ретровирусной трансдукции. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап лентивирусной трансдукции. Системы лентивирусной трансдукции известны в данной области техники и описаны, *например*, в источниках: Levine, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* **2006,** 103, 17372-77; Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. **1997,** 15, 871-75; Dull, et al., J. Virology **1998,** 72, 8463-71, и патенте США № 6627442, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап гамма-ретровирусной трансдукции. Системы гамма-ретровирусной трансдукции известны в данной области техники и описаны, *например,* в источнике:

Cepko и Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. **1996,** 9,9.1-9,9.16, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап транспозон-опосредованного генного переноса. Системы транспозон-опосредованного переноса генов известны в данной области техники и включают системы, отличающиеся тем, что транспозаза представлена в виде экспрессионного ДНК-вектора или экспрессируемой РНК или белка, так что долговременная экспрессия указанной транспозазы в трансгенных клетках не происходит, например, транспозаза представлена в виде мРНК (*например*, мРНК, содержащей кэп и поли-А-«хвост»). Подходящие системы транспозон-опосредованного переноса генов, в том числе Tel-подобная транспозаза типа транспозаз лососевых (транспозаза SB, или «Sleeping Beauty»), такая как SB10, SB11 и SB100x, и сконструированные ферменты с повышенной ферментативной активностью, описаны, *например,* в источниках: Hackett, et al., Mol. Therapy **2010,** 18, 674-83 и патент США № 6489458, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[001015] Согласно варианту реализации указанный способ включает способ генетической модификации популяции TIL, *например,* первой популяции, второй популяции и/или третьей популяции согласно описанию в настоящем документе. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап стабильного встраивания генов для продуцирования или ингибирования (*например,* сайленсинга) одного или более белков. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап электропорации. Способы электропорации известны в данной области техники и описаны, *например,* в источниках: Tsong, Biophys. J. **1991,** 60, 297-306, и опубликованная заявка на патент США № 2014/0227237 A1, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Могут применяться другие способа электропорации, известные в данной области техники, такие как описанные в патентах США №№ 5019034; 5128257; 5137817; 5173158; 5232856; 5273525; 5304120; 5318514; 6010613 и 6078490, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой стерильный способ электропорации. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы обработки TIL импульсным электрическим полем для изменений, проведения манипуляций или введения определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающий этап воздействия на TIL последовательностью из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо программируемых электрических импульсов постоянного тока с напряженностью поля, равной или превышающей 100 В/см, причем указанная последовательность по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока

имеет одну, две или три из следующих характеристик: (1) по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга амплитудой импульса; (2) по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга шириной импульса; и (3) первый интервал между импульсами первой группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов, отличается от второго интервала между импульсами второй группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы обработки TIL импульсным электрическим полем для изменений, проведения манипуляций или введения определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающий этап воздействия на TIL последовательностью из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо программируемых электрических импульсов постоянного тока с напряженностью поля, равной или превышающей 100 В/см, при этом по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга амплитудой импульса. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы обработки TIL импульсным электрическим полем для изменений, проведения манипуляций или введения определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающий этап воздействия на TIL последовательностью из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо программируемых электрических импульсов постоянного тока с напряженностью поля, равной или превышающей 100 В/см, при этом по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга шириной импульса. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы обработки TIL импульсным электрическим полем для изменений, проведения манипуляций или введения определенных и контролируемых, постоянных или временных изменений в TIL, включающий этап воздействия на TIL последовательностью из по меньшей мере трех одиночных, управляемых оператором, независимо программируемых электрических импульсов постоянного тока с напряженностью поля, равной или превышающей 100 В/см, при этом первый интервал между импульсами первой группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов, отличается от второго интервала между импульсами второй группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов. Согласно варианту реализации указанный способ электропорации представляет собой способ импульсной электропорации, включающий этапы обработки TIL импульсными электрическими полями для индукции образования пор в указанных TIL, включающий этап воздействия последовательностью по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока с с напряженностью поля, равной или превышающей 100 В/см, на TIL, причем указанная последовательность по меньшей мере трех электрических импульсов постоянного тока имеет одну, две или три из следующих характеристик: (1) по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга амплитудой

импульса; (2) по меньшей мере два из по меньшей мере трех импульсов отличаются друг от друга шириной импульса; и (3) первый интервал между импульсами первой группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов, отличается от второго интервала между импульсами второй группы, включающей два из по меньшей мере трех импульсов, таким образом, чтобы индуцированные поры сохранялись в течение относительно длительного периода времени, и чтобы сохранялась жизнеспособность TIL. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап трансфекции с фосфатом кальция. Способы трансфекции с фосфатом кальция (осаждение ДНК фосфатом кальция, покрытие клеточной поверхности и эндоцитоз) известны в данной области техники и описаны в источниках: Graham и van der Eb, Virology **1973,** 52, 456-467; Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. **1979,** 76, 1373-1376; Chen и Okayarea, Mol. Cell. Biol. **1987,** 7, 2745-2752; и в патенте США № 5593875, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап липосомальной трансфекции. Способы липосомальной трансфекции, такие как способы, для которых используется липосомальный состав с 1:1 (по массе) катионного липида N-[1-(2,3-диолеилокси)пропил]-n, n,n-триметилхлорида аммония (DOTMA) и диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в профильтрованной воде, известны в данной области техники и описаны в источниках: 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, содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. Согласно варианту реализации способ генетической модификации популяции TIL включает этап трансфекции с применением способов, описанных в патентах США № 5766902; № 6025337; № 6410517; № 6475994; и № 7189705; содержание каждого из которых включено посредством ссылки в настоящий документ. TIL могут представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию TIL согласно описанию в настоящем документе.

[001016] Согласно варианту реализации процесс редактирования генов может включать применение программируемой нуклеазы, которая опосредует образование двухцепочечного или одноцепочечного разрыва в одном или более генах иммунных контрольных точек. Такие программируемые нуклеазы позволяют осуществлять точное редактирование генома путем введения разрывов в определенных геномных локусах, т.е. из действие основано на распознавании конкретной последовательности ДНК в геноме для нацеливания нуклеазного домена в определенное местоположение и опосредования образования двухцепочечного разрыва в целевой последовательности. После этого двухцепочечный разрыв в ДНК активирует эндогенный механизм репарации в сайте разрыва, опосредующий редактирование генома за счет либо негомологичного соединения концов (NHEJ), либо направляемой гомологией репарации (HDR). Соответственно, репарация разрыва может приводить к введению

инсерционных/делеционных мутаций, которые разрушают (*например*, приводят к сайленсингу, репрессии или усилению) продукт целевого гена.

[001017] Основные классы нуклеаз, которые были разработаны для обеспечения сайт-специфического редактирования генома, включают нуклеазы с цинковыми пальцами (ZFN), нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и нуклеазы, ассоциированные с CRISPR (например, CRISPR/Cas9). Указанные нуклеазные системы можно в целом разделить на две категории в зависимости от способа распознавания ДНК: ZFN и TALEN достигают специфического связывания ДНК за счет взаимодействий белок/ДНК, тогда как системы CRISPR, такие как Cas9, на специфические последовательности ДНК нацеливает молекула короткой гидовой РНК, которая спаривается с основаниями в целевой ДНК прямо и посредством взаимодействий белок/ДНК. *См., например,* Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2.

[001018] Неограничивающие примеры способов редактирования генов, которые могут использоваться в соответствии со способами размножения TIL согласно настоящему изобретению, включают методы CRISPR, TALE и ZFN, которые более подробно описаны ниже. Согласно варианту реализации способ размножения TIL в терапевтическую популяцию может соответствовать любому варианту реализации способов, описанных в настоящем документе (например, процесс Gen 3) или в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, при этом он также включает редактирование генов по меньшей мере части TIL одним или несколькими способами CRISPR, TALE или ZFN для получения TIL, которые могут обеспечивать улучшенный терапевтический эффект. Согласно варианту реализации может быть проведена оценка улучшенного терапевтического эффекта TIL с отредактированными генами путем сравнения с немодифицированными TIL in vitro, *например*, путем сравнения с эффекторной функции in vitro, профилей цитокинов и т.п., TIL с отредактированными генами и немодифицированных TIL. Согласно некоторым способам реализации указанный способ включает редактирование генов в популяции TIL с применением CRISPR, TALE и/или ZFN.

[001019] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для доставки системы редактирования генов, такой как CRISPR, TALEN и ZFN, применяют электропорацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная система электропорации представляет собой проточную систему электропорации. Примером подходящей проточной системы электропорации, подходящей для применения в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения, является коммерчески доступная система MaxCyte STX. Существует ряд альтернативных коммерчески доступных инструментов для электропорации, которые могут подходить для применения согласно настоящему изобретению, например, система AgilePulse или ECM 830, доступная от BTX-Harvard Apparatus, Cellaxess Elektra (Cellectricon), Nucleofector (Lonza/Amaxa), GenePulser MXcell (BIORAD), iPorator-96 (Primax) или siPORTer96 (Ambion). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения система

электропорации входит в состав закрытой стерильной системы вместе с остальными этапами способа размножения TIL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная система электропорации представляет собой импульсную систему электропорации согласно описанию в настоящем документе, и входит в состав закрытой стерильной системы вместе с остальными этапами способа размножения TIL

[001020] Способ размножения TIL в терапевтическую популяцию может соответствовать любому варианту реализации способов, описанных в настоящем документе (например, процесс GEN 3) или описанных в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, при этом указанный способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с применением способа CRISPR (*например,* CRISPR/Cas9 или CRISPR/Cpf1). В соответствии с конкретными вариантами реализации применение способа CRISPR в процессе размножения TIL приводит к сайленсингу или снижению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL. Как вариант, применение способа CRISPR в процессе размножения TIL приводит к усилению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL.

[001021] CRISPR означает «Кластерные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы». Способ использования системы CRISPR для редактирования генов также называется в настоящем документе способом CRISPR. Существует три типа систем CRISPR, которые включают РНК и Cas белки, и которые могут применяться в соответствии с настоящим изобретением: Тип I, II и III. CRISPR типа II (примером которой является Cas9) представляет собой одну из наиболее хорошо описанных систем.

[001022] Технология CRISPR основана на адаптированных естественных защитных механизмах бактерий и архей (домен одноклеточных микроорганизмов). Эти организмы используют РНК из CRISPR и различные белки Cas, включая Cas9, для отражения атак вирусов и других инородных тел за счет измельчения и разрушения ДНК чужеродного агента. CRISPR представляет собой специализированную область ДНК с двумя отличительными характеристиками: наличие нуклеотидных повторов и спейсеров. Повторяющиеся последовательности нуклеотидов распределены по всей области CRISPR, перемежаясь вкраплениями коротких сегментов чужеродной ДНК (спейсерами) среди повторяющихся последовательностей. В системе CRISPR/Cas II типа спейсеры интегрированы в геномные локусы CRISPR и транскрибируются и процессируются в короткую CRISPR-РНК (crRNA). Указанные crRNA гибридизуются с трансактивирующими crRNA (tracrRNA) и направляют специфичные к последовательностям расщепление и сайленсинг патогенной ДНК белками Cas. Для распознавания мишени белком Cas9 требуется «затравочная» последовательность в crRNA и последовательность консервативного динуклеотид-содержащего прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM) перед областью связывания crRNA. Соответственно,

система CRISPR/Cas может быть перенаправлена на расщепление практически любой последовательности ДНК за счет изменения конструкции crRNA. CrRNA и tracrRNA в естественной системе могут быть упрощены с образованием одиночной гидовой РНК (огРНК) размером приблизительно 100 нуклеотидов для генно-инженерного применения. Система CRISPR/Cas может напрямую быть перенесена в клетки человека путем совместной доставки плазмид, экспрессирующих эндонуклеазу Cas9 и необходимые компоненты crRNA. Для снижения ограничений нацеливания можно использовать различные варианты белков Cas (*например*, ортологи Cas9, такие как Cpf1).

[001023] Неограничивающие примеры генов, сайленсинг или ингибирование которых может происходить при долгосрочном редактировании генов TIL способом CRISPR включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, ТФР-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.

[001024] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены при долгосрочном редактировании генов TIL способом CRISPR, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, ИЛ-2, IL12, ИЛ-15 и ИЛ-21.

[001025] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии целевой генной последовательности способом CRISPR, которые могут применяться в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения, описаны в патентах США №№ 8697359; 8993233; 8795965; 8771945; 8889356; 8865406; 8999641; 8945839; 8932814; 8871445; 8906616; и 8895308, которые включены посредством ссылки в настоящий документ. Материалы для реализации способов CRISPR, такие как плазмиды для экспрессии CRISPR/Cas9 и CRISPR/Cpf1, коммерчески доступны в таких компаниях, как GenScript.

[001026] Согласно варианту реализации генетические модификации с популяциями TIL, согласно описанию в настоящем документе, могут быть выполнены с использованием системы CRISPR/Cpf1, как описано в патенте США № US 9790490, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ.

[001027] Способ размножения TIL в терапевтическую популяцию может соответствовать любому варианту реализации способов, описанных в настоящем документе (*например,* процесс 2A) или согласно описанию в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, при этом указанный способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с применением способа TALE. В соответствии с конкретными вариантами реализации применение способа TALE в процессе размножения TIL приводит к сайленсингу или снижению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL. Как вариант, применение способа TALE в процессе размножения TIL

приводит к усилению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL.

[001028] TALE означает «эффекторные белки, подобные активаторам транскрипции», которые включают TALEN («эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции»). Способ применения системы TALE для редактирования генов также может называться в настоящем документе способом TALE. TALE представляют собой встречающиеся в природе белки фитопатогенных бактерий рода Xanthomonas и содержат ДНК-связывающие домены, состоящие из серии повторяющихся доменов из 33-35 аминокислот, каждый из которых распознает одну пару оснований. Специфичность TALE определяется двумя гипервариабельными аминокислотами, которые известны как «repeat variable di-residues», двойной остаток с варьирующим числом повторов (RVD). Модульные повторы TALE связаны между собой для распознавания смежных последовательностей ДНК. Специфический RVD в ДНК-связывающем домене распознает основание в целевом локусе, обеспечивая структурный признак для сборки предсказуемых ДНК-связывающих доменов. ДНК-связывающие домены TALE сливаются с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI типа IIS с образованием целевой нуклеазы TALE. Чтобы индуцировать сайт-специфическую мутацию, два отдельных фрагмента TALEN, разделенных спейсерной областью из 14-20 пар оснований, приводят мономеры FokI в непосредственную близость для димеризации и создания направленного двухцепочечного разрыва.

[001029] В нескольких крупных систематических исследованиях с использованием различных способов сборки показано, что повторы TALE можно комбинировать для распознавания практически любой заданной пользователем последовательности. Заказные панели TALE также коммерчески доступны от Cellectis Bioresearch (Париж, Франция), Transposagen Biopharmaceuticals (Лексингтон, Кентукки, США) и Life Technologies (Гранд-Айленд, Нью-Йорк, США). Способы TALE и TALEN, подходящие для использования в настоящем изобретении, описаны в опубликованных заявках на патент США US 2011/0201118 A1; US 2013/0117869 A1; US 2013/0315884 A1; US 2015/0203871 A1 и US 2016/0120906 A1, содержание которых включено посредством ссылки в настоящий документ.

[001030] Неограничивающие примеры генов, сайленсинг или ингибирование которых может происходить при долгосрочном редактировании генов TIL способом TALE, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, ТФР-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.

[001031] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены при долгосрочном редактировании генов TIL способом TALE, включают CCR2, CCR4, CCR5,

CXCR2, CXCR3, CX3CR1, ИЛ-2, IL12, ИЛ-15 и ИЛ-21.

[001032] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии целевой генной последовательности, которые могут применяться в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения, описаны в патенте США № 8586526, который включен посредством ссылок в настоящий документ.

[001033] способ размножения TIL в терапевтическую популяцию может соответствовать любому варианту реализации способов, описанных в настоящем документе (например, процесс GEN 3) или описанных в PCT/US2017/058610, PCT/US2018/012605 или PCT/US2018/012633, отличающийся тем, что указанный способ дополнительно включает редактирование генов по меньшей мере части TIL с применением способа на основе цинковых пальцев или нуклеаз с цинковыми пальцами. В соответствии с конкретными вариантами реализации применение способа с цинковыми пальцами в процессе размножения TIL приводит к сайленсингу или снижению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL. Как вариант, применение способа с цинковыми пальцами в процессе размножения TIL приводит к усилению экспрессии одного или более генов иммунных контрольных точек по меньшей мере в части терапевтической популяции TIL.

[001034] Отдельный цинковый палец содержит примерно 30 аминокислот в консервативной конфигурации ββα. Несколько аминокислот на поверхности α-спирали обычно контактируют с 3 п.о. в большой бороздке ДНК с различным уровнем избирательности. Цинковые пальцы содержат два белковых домена. Первый домен - ДНК-связывающий домен, который включает факторы транскрипции эукариот и содержит цинковый палец. Второй домен представляет собой нуклеазный домен, который включает рестрикционный фермент FokI и отвечает за каталитическое расщепление ДНК.

[001035] ДНК-связывающие домены отдельных ZFN обычно содержат от трех до шести отдельных повторов цинковых пальцев, и каждый может распознавать от 9 до 18 пар оснований. Если домены с цинковыми пальцами специфичны для предполагаемого целевого сайта, то даже пара 3-пальцевых ZFN, которые распознают в общей сложности 18 пар оснований, теоретически может быть нацелена на один локус в геноме млекопитающих. Одним из методов создания новых панелей цинковых пальцев является объединение меньших «модулей» из цинковых пальцев с известной специфичностью. Наиболее распространенный процесс модульной сборки включает объединение трех отдельных цинковых пальцев, каждый из которых может распознавать последовательность ДНК из 3 пар оснований, для создания массива из 3 пальцев, который может распознавать целевой сайт из 9 пар оснований. Как вариант, подходы на основе отбора, такие как разработка олигомеризованного пула (OPEN), могут использоваться для отбора новых панелей цинковых пальцев из рандомизированных библиотек, которые учитывают контекстно-зависимые взаимодействия между соседними «пальцами». Сконструированные «цинковые пальцы» доступны коммерчески; Sangamo Biosciences

(Ричмонд, Калифорния, США) разработала специализированную платформу (CompoZr®) для создания цинковых пальцев в партнерстве с Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США).

[001036] Неограничивающие примеры генов, сайленсинг или ингибирование которых может происходить при долгосрочном редактировании генов TIL с помощью способа на основе цинковых пальцев, включают PD-1, CTLA-4, LAG-3, HAVCR2 (TIM-3), Cish, ТФР-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.

[001037] Неограничивающие примеры генов, которые могут быть усилены при долгосрочном редактировании генов TIL с помощью способа на основе цинковых пальцев, включают CCR2, CCR4, CCR5, CXCR2, CXCR3, CX3CR1, ИЛ-2, IL12, ИЛ-15 и ИЛ-21.

[001038] Примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии целевой генной последовательности с помощью способа на основе цинковых пальцев, которые могут применяться в соответствии с вариантами реализации 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 включены посредством ссылки в настоящий документ.

[001039] Другие примеры систем, способов и композиций для изменения экспрессии целевой генной последовательности с помощью способа на основе цинковых пальцев, которые могут применяться в соответствии с вариантами реализации настоящего изобретения, описаны в источнике: Beane, et al., Mol. Therapy, **2015,** 23 1380-1390, содержание которого включено посредством ссылки в настоящий документ.

[001040] Согласно некоторым вариантам реализации TIL необязательно генетически сконструированы так, чтобы включать дополнительные функциональные группы, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, высокоаффинный Т-клеточный рецептор (TCR), *например,* TCR, нацеленный на опухоль-ассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1, или химерный антигенный рецептор (CAR), который связывается с опухоль-ассоциированной молекулой поверхности клетки (*например,* мезотелином) или линиеспецифической молекулой поверхности клетки (*например,* CD19). Согласно некоторым вариантам реализации указанный способ включает генетическое конструирование в популяции TIL, для включения высокоаффинного Т-клеточного рецептора (TCR), *например,* TCR, нацеленного на опухоль-ассоциированный антиген, такой как MAGE-1, HER2 или NY-ESO-1 или химерного антигенного рецептора (CAR), который связывается с опухоль-ассоциированной молекулой поверхности клетки (*например,* мезотелином) или

линиеспецифической молекулой поверхности клетки (*например,* CD19). В подходящих случаях указанная популяция TIL может представлять собой первую популяцию, вторую популяцию и/или третью популяцию согласно описанию в настоящем документе.

Закрытые системы для получения TIL

[001041] Согласно настоящему изобретению предложено применение закрытых систем в процессе культивирования TIL. Такие закрытые системы позволяют предотвращать и/или снижать загрязнение микроорганизмами, использовать меньшее число флаконов и снизить затраты. Согласно некоторым вариантам реализации в закрытой системе используются два контейнера.

[001042] Такие закрытые системы хорошо известны в данной области техники и их описание можно найти, например, по ссылкам: http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm и https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.

[001043] Стерильные соединители (STCD) обеспечивают стерильную спайку двух фрагментов совместимой трубки. Указанная процедура позволяет стерильно соединять различные контейнеры и трубки с разными диаметрами. Согласно некоторым вариантам реализации указанные закрытые системы включают системы с люэровскими переходниками и герметизируемые термосваркой системы согласно описанию, например, в примере G. Согласно некоторым вариантам реализации доступ в указанные закрытые системы осуществляется через шприцы в стерильных условиях для поддержания стерильности и закрытого характера системы. Согласно некоторым вариантам реализации используют закрытую систему согласно описанию в примере G. Согласно некоторым вариантам реализации TIL вводят в состав готового итогового продукта в контейнере в соответствии со способом, описанным в Примере G, раздел «Получение итогового состава и наполнение».

[001044] Согласно некоторым вариантам реализации в закрытой системе используют один контейнер с момента взятия фрагментов опухоли до момента, когда TIL будут готовы для введения пациенту или криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации, когда используют два контейнера, первый контейнер представляет собой закрытый G-контейнер, и популяцию TIL центрифугируют и переносят в пакет для инфузии, не открывая первый закрытый G-контейнер. Согласно некоторым вариантам реализации когда используют два контейнера, пакет для инфузии представляет собой содержащий HypoThermosol пакет для инфузии. Закрытая система или закрытая система культивирования клеток TIL отличается тем, что после добавления образца опухоли и/или фрагментов опухоли систему герметично закрывают снаружи с образованием закрытой среды, не подверженной вторжению бактерий, грибов и/или любому другому микробному загрязнению.

[001045] Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 100%. Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет от

приблизительно 5% до приблизительно 95%. Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет от приблизительно 5% до приблизительно 90%. Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет от приблизительно 10% до приблизительно 90%. Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет от приблизительно 15% до приблизительно 85%. Согласно некоторым вариантам реализации снижение микробного загрязнения составляет приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 15%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85%, приблизительно 90%, приблизительно 95%, приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или приблизительно 100%.

[001046] Закрытая система позволяет культивировать TIL в отсутствие и/или при значительном снижении микробного загрязнения.

[001047] Кроме того, pH, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода в среде культивирования клеток TIL изменяют в процессе культивирования клеток. Следовательно, даже несмотря на циркуляцию среды, подходящей для клеточной культуры, в закрытой среде все равно необходимо поддерживать оптимальные условия для пролиферации TIL. Поэтому желательно контролировать физические факторы: pH, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода в культуральной жидкости закрытой среды - с помощью датчика, сигнал которого использует для управления газообменником, установленным на входе в среду культивирования, и регулировать парциальное давление газа в закрытой среде в реальном времени в соответствии с изменениями в культуральной жидкости для оптимизации условий среды культивирования клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложена закрытая система культивирования клеток, на входе в которую установлен газообменник, оборудованный устройством мониторинга, измеряющим pH, парциальное давление диоксида углерода и парциальное давление кислорода в закрытой среде и оптимизирующим условия среды клеточной культуры, автоматически регулируя концентрации газов на основании сигналов, поступающих от устройства мониторинга.

[001048] Согласно некоторым вариантам реализации давление в закрытой среде контролируют непрерывно или периодически. А именно, давление в замкнутой среде можно изменять, например, с помощью устройства для поддержания давления, обеспечивая таким образом пригодность пространства для роста TIL при положительном давлении, или способствуя экссудации жидкости при отрицательном давлении и таким образом способствуя пролиферации клеток. Кроме того, периодическое использование отрицательного давления позволяет равномерно и эффективно заменять циркулирующую в закрытой среде жидкость за счет временного сокращения объема закрытой среды.

[001049] Согласно некоторым вариантам реализации оптимальные компоненты культуры для пролиферации TIL могут заменяться или добавляться, и могут быть включены такие факторы, как ИЛ-2 и/или OKT3, а также их комбинация.

Необязательный криоконсервация TIL

[001050] Смешанная популяция TIL (например, вторая популяция TIL) либо размноженная популяция TIL (например, третья популяция TIL) может быть необязательно криоконсервирована. Согласно некоторым вариантам реализации проводят криоконсервацию терапевтической популяции TIL. Согласно некоторым вариантам реализации проводят криоконсервацию TIL, собранных после второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации проводят криоконсервацию TIL в ходе иллюстративного этапа F на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации TIL криоконсервируют в пакете для инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации TIL криоконсервируют перед помещением в пакет для инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации TIL криоконсервируют и не помещают в пакет для инфузии. Согласно некоторым вариантам реализации криоконсервацию осуществляют с использованием среды для криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО). Обычно это осуществляют путем помещения популяции TIL в замораживающий раствор, например, содержащий 85% инактивированной комплементом сыворотки AB и 15% диметилсульфоксида (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные сосуды и выдерживают в течение 24 часов при -80°C с необязательным размещением в морозильных камерах с газообразным азотом для криоконсервации. См., Sadeghi, et al., Acta Oncologica **2013,** 52, 978-986.

[001051] При необходимости клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не будет размерзено приблизительно 4/5 раствора. Клетки обычно ресуспендируют в полной среде и необязательно промывают один или несколько раз. Согласно некоторым вариантам реализации размороженные TIL могут быть подсчитаны и их жизнеспособность определена известными в данной области техники способами.

[001052] Согласно предпочтительному варианту реализации популяцию TIL криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации CS10 (CryoStor 10, BioLife Solutions). Согласно предпочтительному варианту реализации популяцию TIL криоконсервируют с использованием среды для криоконсервации, содержащей диметилсульфоксид (ДМСО). Согласно предпочтительному варианту реализации популяцию TIL криоконсервируют, используя отношение CS10 и клеточной культуральной среды 1:1 (по объему). Согласно предпочтительному варианту реализации популяцию TIL криоконсервируют, используя отношение CS10 и клеточной культуральной среды 1:1 (по объему), также содержащей дополнительный ИЛ-2.

[001053] Согласно обсуждению выше и описанию в примерах этапов A - E, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), криоконсервация

может быть проведена в многочисленные моменты на протяжении всего процесса размножения TIL. Согласно некоторым вариантам реализации может быть криоконсервирована размноженная популяция TIL после второго размножения (как показано, например, на этапе D фиг. 1 (в частности, например, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Криоконсервацию, в общем случае, можно провести, поместив популяцию TIL в замораживающий раствор, например, 85% инактивированной комплементом сыворотки AB и 15% диметилсульфоксид (ДМСО). Клетки в растворе помещают в криогенные сосуды и выдерживают в течение 24 часов при -80°C с необязательным размещением в морозильных камерах с газообразным азотом для криоконсервации. См. Sadeghi, et al., Acta Oncologica **2013,** 52, 978-986. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL криоконсервируют в 5% ДМСО. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL криоконсервируют в клеточной культуральной среде+5% ДМСО. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL криоконсервируют в соответствии со способами, описанными в примере D.

[001054] При необходимости клетки извлекают из морозильной камеры и размораживают на водяной бане при 37°C до тех пор, пока не будет разморожено приблизительно 4/5 раствора. Клетки обычно ресуспендируют в полной среде и необязательно промывают один или несколько раз. Согласно некоторым вариантам реализации размороженные TIL могут быть подсчитаны и их жизнеспособность определена известными в данной области техники способами.

[001055] В некоторых случаях популяция TIL с этапа B может быть немедленно криоконсервирована с применением протоколов, обсуждаемых ниже. Как вариант, смешанная популяция TIL может быть подвергнута этапу C и этапу D и затем криоконсервирована согласно после этапа D. Аналогичным образом, при использовании в терапии генетически модифицированных TIL, популяция с TIL этапа B или этапа D может быть подвергнута генетическим модификациям для подходящей обработки.

Фенотипические характеристики размноженных TIL

[001056] Согласно определенному варианту реализации указанные TIL анализируют на экспрессию многочисленных фенотипических маркеров после размножения, в том числе описанные в настоящем документе и в примерах. Согласно варианту реализации исследуют экспрессию одного или более фенотипических маркеров. Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические характеристики TIL анализируют после первого размножения на этапе B. Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические характеристики TIL анализируют при переходе на этап C. Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические характеристики TIL анализируют при переходе по этапу C и после криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические характеристики TIL анализируют после второго размножения в соответствии с этапом D. Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические характеристики TIL анализируют после двух или более размножений в соответствии с этапом D.

[001057] Согласно некоторым вариантам реализации указанный маркер выбран из группы, состоящей из CD8 и CD28. Согласно некоторым вариантам реализации исследуют экспрессию CD8. Согласно некоторым вариантам реализации исследуют экспрессию CD28. Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия CD8 и/или CD28 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (*например,* процессом Gen 3 согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия CD8 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (*например,* процессом Gen 3 согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации экспрессия CD28 выше на TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (*например,* процессом Gen 3 согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1A)). Согласно некоторым вариантам реализации высокая экспрессия CD28 является показателем более молодого и персистирующего фенотипа TIL. Согласно варианту реализации измеряют экспрессию одного или более регуляторных маркеров.

[001058] Согласно варианту реализации не проводят отбор в первой популяции TIL, второй популяции TIL, третьей популяции TIL или собранной популяции TIL на основании экспрессия CD8 и/или CD28 на каких-либо этапах способа размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), описанного в настоящем документе.

[001059] Согласно некоторым вариантам реализации процент клеток центральной памяти выше среди TIL, полученных в соответствии с процессом согласно настоящему изобретению, по сравнению с другими процессами (*например,* процессом Gen 3 согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), по сравнению с процессом 2A согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например,* Фиг. 1A)). Согласно некоторым вариантам реализации маркер памяти клеток центральной памяти выбран из группы, состоящей из CCR7 и CD62L.

[001060] Согласно некоторым вариантам реализации подгруппы клеток памяти CD4+ и/или CD8+ TIL могут быть разделены на другие подгруппы клеток памяти. Согласно некоторым вариантам реализации CD4+ и/или CD8+ TIL содержат необученные (CD45RA+CD62L+) TIL. Согласно некоторым вариантам реализации CD4+ и/или CD8+ TIL содержат TIL центральной памяти (CM; CD45RA-CD62L+). Согласно некоторым вариантам реализации CD4+ и/или CD8+ TIL содержат TIL, представляющие собой эффекторные клетки памяти (EM; CD45RA-CD62L-). Согласно некоторым вариантам реализации CD4+ и/или CD8+ TIL содержат RA+ эффекторные клетки памяти

/эффекторные (TEMRA/TEFF; CD45RA+CD62L+) TIL. Согласно некоторым вариантам реализации наблюдается более высокий %CD8+ по сравнению с популяцией CD4+.

[001061]

[001062] Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL экспрессируют один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из гранзима B, перфорина и гранулизина. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL экспрессируют гранзим B. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL экспрессируют перфорин. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL экспрессируют гранулизин.

[001063] Согласно варианту реализации может также быть проведена оценка высвобождения цитокинов в рестимулированных TIL с применением анализов высвобождения цитокинов. Согласно некоторым вариантам реализации может быть проведена оценка секреции интерферона-γ (ИФН-γ) клетками TIL. Согласно некоторым вариантам реализации секрецию ИФН-γ измеряют с помощью ИФА ELISA. Согласно некоторым вариантам реализации секрецию ИФН-γ измеряют с помощью ИФА ELISA после этапа быстрого второго размножения, после этапа D, описанного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации оценивают здоровье TIL по секреции ИФН-гамма (ИФН-γ). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ является показателем активных TIL. Согласно некоторым вариантам реализации используют анализ активности для определения продуцирования ИФН-γ. Продуцирование ИФН-γ представляет собой еще один показатель цитотоксического потенциала. Продуцирование ИФН-γ может быть измерено путем определения уровней цитокина ИФН-γ в среде от TIL, стимулированных антителами CD3, CD28 и CD137/4-1BB. Уровни ИФН-γ в среде от указанных стимулированных TIL могут быть определены путем измерения высвобождения ИФН-γ. Согласно некоторым вариантам реализации повышение продуцирования ИФН-γ, например, TIL на этапе D процесса Gen 3, как показано на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) по сравнению, например, с этапом D процесса 2A, как показано на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1A), является показателем повышения цитотоксического потенциала TIL с этапа D. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в один раз, в два, три, четыре, или пять или более раз. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в один раз. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в два раза. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в три раза. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в четыре раза. Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в пять раз. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют с применением набора для ИФА ELISA Quantikine. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в TIL ex vivo. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в TIL ex vivo, в том числе в TIL, полученных с применением способов согласно настоящему изобретению,

включая, например способы с фиг. 1B.

[001064] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные по меньшей мере в один раз, два раза, в три раза, в четыре раза или в пять раз больше ИФН-γ или более, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные секретировать по меньшей мере в один раз больше ИФН-γ, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные секретировать по меньшей мере в два раза больше ИФН-γ, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные секретировать по меньшей мере в три раза больше ИФН-γ, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные секретировать по меньшей мере в четыре раза больше ИФН-γ, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, способные секретировать по меньшей мере в пять раз больше ИФН-γ, представлены TIL, полученными с помощью способов размножения согласно настоящему изобретению, включая, например, способы с фиг. 1B и/или фиг. 1C.

[001065] Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются за счет соматической рекомбинации ограниченного, но значительного количества генных сегментов. Указанные генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразие), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующее применение иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Согласно настоящему изобретению предложен способ получения TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными с применением способов, называемых процессом 2A, согласно иллюстративному описанию на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1A). Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при первом размножении, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно

некоторым вариантам реализации указанное увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к тяжелой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к легкой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к Т-клеточному рецептору. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к одному из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии TCRab (*т.е.* TCRα/β). Согласно некоторым вариантам реализации процесс согласно описанию в настоящем документе (*например,* процесс Gen 3) демонстрирует большее клональное разнообразие по сравнению с другими процессами, например, процессом, называемым Gen 2, на основании количества уникальных пептидных CDR в образце (*см., например*, фиг. 12-14).

[001066] Согласно некоторым вариантам реализации активация и истощение TIL могут быть определены путем анализа одного или более маркеров. Согласно некоторым вариантам реализации указанные активация и истощение могут быть определены с применением многоцветной проточной цитометрии. Согласно некоторым вариантам реализации маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленными, один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из CD3, PD-1, 2B4/CD244, CD8, CD25, BTLA, KLRG, TIM-3, CD194/CCR4, CD4, TIGIT, CD183, CD69, CD95, CD127, CD103 и/или LAG-3). Согласно некоторым вариантам реализации маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленными, один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, PD-1, TIGIT и/или TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации маркеры активации и истощения включают, не ограничиваясь перечисленными, один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из BTLA, CTLA-4, ICOS, Ki67, LAG-3, CD103+/CD69+, CD103+/CD69-, PD-1, TIGIT и/или TIM-3. Согласно некоторым вариантам реализации Т-клеточные маркеры (в том числе маркеры активации и истощения) могут быть определены и/или проанализированы для изучения функции активации или ингибирования Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации маркеры Т-клеток могут включать, не ограничиваясь перечисленными, один или более маркеров, выбранных из группы, состоящей из TIGIT, CD3, FoxP3, Tim-3, PD-1, CD103, CTLA-4, LAG-3, BTLA-4, ICOS, Ki67, CD8, CD25, CD45, CD4 и/или CD59.

[001067] Согласно некоторым вариантам реализации фенотипические

характеристики исследуют после криоконсервации.

Дополнительные варианты реализации процесса

[001068] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) взятие первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, взятого у указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2 и OKT-3, отличающийся тем, что указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение приблизительно от 1 до 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL; (c) проведение быстрого второго размножения путем приведения в контакт указанной второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением а третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение приблизительно 1-10 дней с получением указанной третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c). Согласно некоторым вариантам реализации указанный этап быстрого второго размножения разделяют на множество этапов для вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса второй популяции TIL из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнер G-REX 500MCS, отличающийся тем, что в указанном втором контейнере вторую популяцию TIL из маломасштабной культуры культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй маломасштабной культуре на протяжении периода,

составляющего приблизительно 4-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5-7 дней.

[001069] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) взятие первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, взятого у указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2 и OKT-3, отличающийся тем, что указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение приблизительно от 1 до 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL; (c) проведение быстрого второго размножения путем приведения в контакт указанной второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением а третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение приблизительно от 1 до 8 дней с получением указанной третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

(d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c). Согласно некоторым вариантам реализации указанный этап быстрого второго размножения разделяют на множество этапов для вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса второй популяции TIL из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* а контейнер G-REX 500MCS, при этом в указанном втором контейнере вторую популяцию TIL из маломасштабной культуры культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-8 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй маломасштабной культуре на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-6 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и

пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-5 дней.

[001070] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (a) взятие первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем обработки образца опухоли, взятого у указанного субъекта, с получением множества фрагментов опухоли; (b) проведение подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2 и OKT-3, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение приблизительно от 1 до 7 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL; (c) проведение быстрого второго размножения путем приведения в контакт указанной второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением а третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение приблизительно 1-11 дней с получением указанной третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c). Согласно некоторым вариантам реализации указанный этап быстрого второго размножения разделяют на множество этапов для вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса второй популяции TIL из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнер G-REX 500MCS, при этом в указанном втором контейнере вторую популяцию TIL из маломасштабной культуры культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19

или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй маломасштабной культуре на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно некоторым вариантам реализации этап быстрого размножения разделяют на несколько этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (1) проведения быстрого второго размножения путем культивирования второй популяции TIL в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 4 дня, и последующего (2) осуществления переноса и пропорционального перераспределения второй популяции TIL из первой маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть второй популяции TIL, перенесенных из маломасштабной культуры в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5 дней.

[001071] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем приведения в контакт первой популяции TIL с культуральной средой, которая дополнительно содержит экзогенные антигенпрезентирующие клетки (АПК), при этом число АПК в культуральной среде на этапе (c) больше числа АПК в культуральной среде на этапе (b).

[001072] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) в культуральную среду добавляют дополнительные экзогенные АПК.

[001073] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 20:1.

[001074] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[001075] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 9:1.

[001076] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 8:1.

[001077] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 7:1.

[001078] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 6:1.

[001079] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или

приблизительно) 5:1.

[001080] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[001081] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[001082] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[001083] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[001084] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[001085] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,6:1.

[001086] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа

АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[001087] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[001088] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[001089] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[001090] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[001091] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1,1:1 до (точно или приблизительно) 2:1.

[001092] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 10:1.

[001093] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 5:1.

[001094] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 4:1.

[001095] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 3:1.

[001096] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,9:1.

[001097] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,8:1.

[001098] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,7:1.

[001099] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или

приблизительно) 2,6:1.

[001100] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,5:1.

[001101] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,4:1.

[001102] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,3:1.

[001103] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,2:1.

[001104] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2:1 до (точно или приблизительно) 2,1:1.

[001105] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных на этапе (b), составляет точно или приблизительно 2:1.

[001106] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК, добавленных при быстром втором размножении, к количеству АПК, добавленных

на этапе (b), составляет точно или приблизительно 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1, 2,1:1, 2,2:1, 2,3:1, 2,4:1, 2,5:1, 2,6:1, 2,7:1, 2,8:1, 2,9:1, 3:1, 3,1:1, 3,2:1, 3,3:1, 3,4:1, 3,5:1, 3,6:1, 3,7:1, 3,8:1, 3,9:1, 4:1, 4,1:1, 4,2:1, 4,3:1, 4,4:1, 4,5:1, 4,6:1, 4,7:1, 4,8:1, 4,9:1 или 5:1.

[001107] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число АПК, добавленное при первичном первом размножении, составляет точно или приблизительно 1×10^8, $1,1\times10^8$, $1,2\times10^8$, $1,3\times10^8$, $1,4\times10^8$, $1,5\times10^8$, $1,6\times10^8$, $1,7\times10^8$, $1,8\times10^8$, $1,9\times10^8$, 2×10^8, $2,1\times10^8$, $2,2\times10^8$, $2,3\times10^8$, $2,4\times10^8$, $2,5\times10^8$, $2,6\times10^8$, $2,7\times10^8$, $2,8\times10^8$, $2,9\times10^8$, 3×10^8, $3,1\times10^8$, $3,2\times10^8$, $3,3\times10^8$, $3,4\times10^8$ или $3,5\times10^8$ АПК, и таким образом, что число АПК, добавленное при быстром втором размножении, составляет точно или приблизительно $3,5\times10^8$, $3,6\times10^8$, $3,7\times10^8$, $3,8\times10^8$, $3,9\times10^8$, 4×10^8, $4,1\times10^8$, $4,2\times10^8$, $4,3\times10^8$, $4,4\times10^8$, $4,5\times10^8$, $4,6\times10^8$, $4,7\times10^8$, $4,8\times10^8$, $4,9\times10^8$, 5×10^8, $5,1\times10^8$, $5,2\times10^8$, $5,3\times10^8$, $5,4\times10^8$, $5,5\times10^8$, $5,6\times10^8$, $5,7\times10^8$, $5,8\times10^8$, $5,9\times10^8$, 6×10^8, $6,1\times10^8$, $6,2\times10^8$, $6,3\times10^8$, $6,4\times10^8$, $6,5\times10^8$, $6,6\times10^8$, $6,7\times10^8$, $6,8\times10^8$, $6,9\times10^8$, 7×10^8, $7,1\times10^8$, $7,2\times10^8$, $7,3\times10^8$, $7,4\times10^8$, $7,5\times10^8$, $7,6\times10^8$, $7,7\times10^8$, $7,8\times10^8$, $7,9\times10^8$, 8×10^8, $8,1\times10^8$, $8,2\times10^8$, $8,3\times10^8$, $8,4\times10^8$, $8,5\times10^8$, $8,6\times10^8$, $8,7\times10^8$, $8,8\times10^8$, $8,9\times10^8$, 9×10^8, $9,1\times10^8$, $9,2\times10^8$, $9,3\times10^8$, $9,4\times10^8$, $9,5\times10^8$, $9,6\times10^8$, $9,7\times10^8$, $9,8\times10^8$, $9,9\times10^8$ или 1×10^9 АПК.

[001108] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число АПК, добавленное при первичном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1×10^8 АПК до (точно или приблизительно) $3,5\times10^8$ АПК, и при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $3,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) 1×10^9 АПК.

[001109] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число АПК, добавленное при первичном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) 3×10^8 АПК, и при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 4×10^8 АПК до (точно или приблизительно) $7,5\times10^8$ АПК.

[001110] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число АПК, добавленное при первичном первом размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 2×10^8 АПК до (точно или приблизительно) $2,5\times10^8$ АПК, и при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, находится в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,5\times10^8$ АПК до (точно или приблизительно) $5,5\times10^8$ АПК.

[001111] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что точно или приблизительно $2,5\times10^8$ АПК добавляют при первичном первом размножении, и точно или приблизительно 5×10^8 АПК добавляют при быстром втором размножении.

[001112] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[001113] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов опухоли распределяют по множеству отдельных контейнеров, в каждом из которых первую популяцию TIL получают на этапе (a), вторую популяцию TIL получают на этапе (b) и третью популяцию TIL получают на этапе (c), и терапевтические популяции TIL из множества контейнеров на этапе (c) объединяют с получением собранной популяции TIL с этапа (d).

[001114] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что несколько опухолей равномерно распределяют по множеству отдельных контейнеров.

[001115] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит по меньшей мере два отдельных контейнера.

[001116] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит от двух до 20 отдельных контейнеров.

[001117] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит от двух до 15 отдельных контейнеров.

[001118] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит от двух до десяти отдельных контейнеров.

[001119] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит от двух до пяти отдельных контейнеров.

[001120] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что множество отдельных контейнеров содержит 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 отдельных контейнеров.

[001121] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что в каждом контейнере, в котором осуществляют подготовительное первое размножение первой популяции TIL на этапе (b), осуществляют и быстрое второе размножение на этапе (c) второй популяции TIL, полученной из такой первой популяции TIL.

[001122] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

[001123] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов опухоли распределяют в один контейнер.

[001124] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный один контейнер содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

[001125] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), а на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 1 слоя клеток до (точно или приблизительно) 3 слоев клеток.

[001126] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 1,5 слоев клеток до (точно или приблизительно) 2,5 слоев клеток.

[001127] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 2 слоя клеток.

[001128] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3 слоя клеток.

[001129] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 3 слоев клеток до (точно или приблизительно) 10 слоев клеток.

[001130] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 4 слоев клеток до (точно или приблизительно) 8 слоев клеток.

[001131] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 слоев клеток.

[001132] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8 слоев клеток.

[001133] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) подготовительное первое размножение осуществляют в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, а на этапе (c) быстрое второе

размножение осуществляют во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область.

[001134] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что второй контейнер больше первого контейнера.

[001135] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) одного слоя клеток до (точно или приблизительно) 3 слоев клеток.

[001136] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 1,5 слоев клеток до (точно или приблизительно) 2,5 слоев клеток.

[001137] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 2 слоя клеток.

[001138] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3 слоя клеток.

[001139] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 3 слоев клеток до (точно или приблизительно) 10 слоев клеток.

[001140] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 4 слоев клеток до (точно или приблизительно) 8 слоев клеток.

[001141] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 слоев клеток.

[001142] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8 слоев клеток.

[001143] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) осуществляют подготовительное первое размножение в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, а на этапе (c) осуществляют быстрое второе размножение в первом контейнере.

[001144] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) одного слоя клеток до (точно или приблизительно) 3 слоев клеток.

[001145] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 1,5 слоев клеток до (точно или приблизительно) 2,5 слоев клеток.

[001146] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней

толщине (точно или приблизительно) 2 слоя клеток.

[001147] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3 слоя клеток.

[001148] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 3 слоев клеток до (точно или приблизительно) 10 слоев клеток.

[001149] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от (точно или приблизительно) 4 слоев клеток до (точно или приблизительно) 8 слоев клеток.

[001150] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 слоев клеток.

[001151] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (c) АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине (точно или приблизительно) 4, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8 слоев клеток.

[001152] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:10.

[001153] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:9.

[001154] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:8.

[001155] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:7.

[001156] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:6.

[001157] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду

первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:5.

[001158] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:4.

[001159] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:3.

[001160] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,1 до (точно или приблизительно) 1:2.

[001161] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в

диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,2 до (точно или приблизительно) 1:8.

[001162] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,3 до (точно или приблизительно) 1:7.

[001163] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,4 до (точно или приблизительно) 1:6.

[001164] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,5 до (точно или приблизительно) 1:5.

[001165] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,6 до (точно или приблизительно) 1:4.

[001166] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное

первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,7 до (точно или приблизительно) 1:3.5.

[001167] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,8 до (точно или приблизительно) 1:3.

[001168] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:1,9 до (точно или приблизительно) 1:2.5.

[001169] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), находится в диапазоне от (точно или приблизительно) 1:2.

[001170] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первичное первое размножение осуществляют путем добавления в клеточную культуральную среду первой популяции TIL с дополнительными антигенпрезентирующими клетками (АПК), при этом число АПК, добавленных на этапе (c), больше числа АПК, добавленных на этапе (b), причем отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе (b),

к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе (c), выбрано из (точно или приблизительно) 1:1,1, 1:1,2, 1:1,3, 1:1,4, 1:1,5, 1:1,6, 1:1,7, 1:1,8, 1:1,9, 1:2, 1:2,1, 1:2,2, 1:2,3, 1:2,4, 1:2,5, 1:2,6, 1:2,7, 1:2,8, 1:2,9, 1:3, 1:3,1, 1:3,2, 1:3,3, 1:3,4, 1:3,5, 1:3,6, 1:3,7, 1:3,8, 1:3,9, 1:4, 1:4,1, 1:4,2, 1:4,3, 1:4,4, 1:4,5, 1:4,6, 1:4,7, 1:4,8, 1:4,9, 1:5, 1:5,1, 1:5,2, 1:5,3, 1:5,4, 1:5,5, 1:5,6, 1:5,7, 1:5,8, 1:5,9, 1:6, 1:6,1, 1:6,2, 1:6,3, 1:6,4, 1:6,5, 1:6,6, 1:6,7, 1:6,8, 1:6,9, 1:7, 1:7,1, 1:7,2, 1:7,3, 1:7,4, 1:7,5, 1:7,6, 1:7,7, 1:7,8, 1:7,9, 1:8, 1:8,1, 1:8,2, 1:8,3, 1:8,4, 1:8,5, 1:8,6, 1:8,7, 1:8,8, 1:8,9, 1:9, 1:9,1, 1:9,2, 1:9,3, 1:9,4, 1:9,5, 1:9,6, 1:9,7, 1:9,8, 1:9,9 или 1:10.

[001171] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет от (точно или приблизительно) 1,5:1 до (точно или приблизительно) 100:1.

[001172] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет точно или приблизительно 50:1.

[001173] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет точно или приблизительно 25:1.

[001174] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет точно или приблизительно 20:1.

[001175] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет точно или приблизительно 10:1.

[001176] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число TIL во второй популяции TIL по меньшей мере точно или приблизительно в 50 раз больше, чем в первой популяции TIL.

[001177] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число TIL во второй популяции TIL по меньшей мере точно или приблизительно в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 раз больше, чем в первой популяции TIL.

[001178] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что точно или приблизительно через 2 дня или точно или приблизительно через 3 дня после начала второго периода на этапе (c) в клеточную культуральную среду добавляют дополнительный ИЛ-2.

[001179] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный так, чтобы дополнительно включать этап криоконсервации собранной популяции TIL на этапе (d) с использованием процесса криоконсервации.

[001180] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный так, чтобы включать проведение после этапа (d) дополнительного этапа (e) переноса собранной популяции TIL с этапа (d) в пакет для инфузии, который необязательно содержит HypoThermosol.

[001181] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный так, чтобы включать этап криоконсервации пакета для инфузии, содержащего собранную популяцию TIL на этапе (e), с использованием процесса криоконсервации.

[001182] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что процесс криоконсервации осуществляют с использованием отношения 1:1 собранной популяции TIL к среде для криоконсервации.

[001183] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[001184] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что МКПК являются облученными и аллогенными.

[001185] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что общее число АПК, добавленных в культуру клеток на этапе (b), составляет $2,5 \times 10^8$.

[001186] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что общее число АПК, добавленных в культуру клеток на этапе (c), составляет 5×10^8.

[001187] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные АПК представляют собой МКПК.

[001188] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что МКПК являются облученными и аллогенными.

[001189] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

[001190] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что сбор на этапе (d) осуществляют с применением мембранной системы обработки клеток.

[001191] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что сбор на этапе (d) осуществляют с применением системы обработки клеток LOVO.

[001192] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 5 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001193] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 10 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001194] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 15 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001195] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 20 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001196] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 25 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001197] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 30 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001198] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 35 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001199] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 40 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001200] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 45 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001201] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 50 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001202] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит точно или приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 или 60 фрагментов на контейнер на этапе (b).

[001203] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий точно или приблизительно 27 $мм^3$.

[001204] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 20 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 50 $мм^3$.

[001205] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 21 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 30 $мм^3$.

[001206] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 22 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 29,5 $мм^3$.

[001207] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 23 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 29 $мм^3$.

[001208] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 24 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 28,5 $мм^3$.

[001209] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 25 $мм^3$ до (точно или приблизительно) 28 $мм^3$.

[001210] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий от (точно или приблизительно) 26,5 мм^3 до (точно или приблизительно) 27,5 мм^3.

[001211] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый фрагмент имеет объем, составляющий точно или приблизительно 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 мм^3.

[001212] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит от (точно или приблизительно) 30 до (точно или приблизительно) 60 фрагментов с общим объемом, составляющим точно или приблизительно 1300 мм^3 до (точно или приблизительно) 1500 мм^3.

[001213] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержат точно или приблизительно 50 фрагментов с общим объемом, составляющим точно или приблизительно 1350 мм^3.

[001214] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанное множество фрагментов содержит точно или приблизительно 50 фрагментов с общей массой, составляющей от (точно или приблизительно) 1 грамма до (точно или приблизительно) 1,5 граммов.

[001215] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что клеточная культуральная среда находится в контейнере, который представляет собой G-контейнер или мешок для культур клеток Xuri.

[001216] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что концентрация ИЛ-2 в клеточной культуральной среде составляет приблизительно от 10000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

[001217] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что концентрация ИЛ-2 в клеточной культуральной среде составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

[001218] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

[001219] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что среда для криоконсервации содержит от 7% до 10% ДМСО.

[001220] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первый период на этапе (b) осуществляют в течение периода, составляющего точно или приблизительно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001221] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что второй период на этапе (c) осуществляют в течение периода, составляющего точно или приблизительно 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней или 11 дней.

[001222] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из периодов, первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c), проводят индивидуально в течение периода, составляющего точно или приблизительно 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001223] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из периодов, первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c), проводят индивидуально в течение периода в течение периода, составляющего точно или приблизительно 5 дней, 6 дней или 7 дней.

[001224] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из периодов, первый период на этапе (b) и второй период на этапе (c), проводят индивидуально в течение периода, составляющего точно или приблизительно 7 дней.

[001225] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 14-18 дней.

[001226] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 15 дней - (точно или приблизительно) 18 дней.

[001227] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 16 дней - (точно или приблизительно) 18 дней.

[001228] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 17 дней - (точно или приблизительно) 18 дней.

[001229] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 14 дней - (точно или приблизительно) 17 дней.

[001230] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 15 дней - (точно или приблизительно) 17 дней.

[001231] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 16 дней - (точно или приблизительно) 17 дней.

[001232] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 14 дней - (точно или приблизительно) 16 дней.

[001233] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 15 дней - (точно или приблизительно) 16 дней.

[001234] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности за (точно или приблизительно) 14 дней.

[001235] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 15 дней.

[001236] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 16 дней.

[001237] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 17 дней.

[001238] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 18 дней.

[001239] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 14 дней или менее.

[001240] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 15 дней или менее.

[001241] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 16 дней или менее.

[001242] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 17 дней или менее.

[001243] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этапы с (a) по (d) осуществляют в общей сложности точно или приблизительно за 18 дней или менее.

[001244] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе (d), содержит достаточно TIL для терапевтически эффективной дозировки указанных TIL.

[001245] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от (точно или приблизительно) $2,3\times10^{10}$ до (точно или приблизительно) $13,7\times10^{10}$.

[001246] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

[001247] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[001248] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 17 дней.

[001249] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что третья популяция TIL на этапе (c) обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 18 дней.

[001250] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, взятые из третьей популяции TIL с этапа (c), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, взятых из второй популяции клеток с этапа (b).

[001251] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из контейнеров, перечисленных для указанного способа, представляет собой закрытый контейнер.

[001252] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из контейнеров, перечисленных для указанного способа, представляет собой G-контейнер.

[001253] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из контейнеров, перечисленных для указанного способа, представляет собой GREX-10.

[001254] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из контейнеров, перечисленных для указанного способа, представляет собой GREX-100.

[001255] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что каждый из контейнеров, перечисленных для указанного способа, представляет собой GREX-500.

[001256] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная с применением способа, описанного в любом из предыдущих параграфов для соответствующих вышеуказанных случаев.

[001257] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) или OKT3.

[001258] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК).

[001259] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL),

полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3.

[001260] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления OKT3.

[001261] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

[001262] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 17 дней.

[001263] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 18 дней.

[001264] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, которая обеспечивает повышенное продуцирование интерферона-гамма.

[001265] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, которая обеспечивает повышенную поликлональность.

[001266] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, которая обеспечивает повышенную эффективность.

[001267] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 17 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 18 дней. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также как описано, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001268] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 17 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием

процесса продолжительностью более 18 дней. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001269] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 17 дней. Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 18 дней. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001270] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), способная продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК). Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001271] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL),

способная продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001272] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001273] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001274] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001275] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, способная продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления OKT3. Согласно некоторым вариантам реализации указанным TIL придают способность

продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма за счет процесса размножения, описанного в настоящем документе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленного, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001276] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные фрагменты опухоли представляют собой биоптаты, полученные путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптаты, биоптаты, полученные путем толстоигольной биопсии, или биоптаты, полученные путем тонкоигольной аспирации.

[001277] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные фрагменты опухоли представляют собой трепанобиоптаты.

[001278] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные фрагменты опухоли представляют собой биоптаты, полученные путем тонкоигольной аспирации.

[001279] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные фрагменты опухоли представляют собой биоптаты, полученные путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию).

[001280] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные фрагменты опухоли представляют собой биоптаты, полученные путем толстоигольной биопсии.

[001281] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что (i) указанный способ включает получение первой популяции TIL из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта, (ii) указанный способ включает проведение этапа культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3 дня, до проведения этапа подготовительного первого размножения, (iii) указанный способ включает проведение подготовительного первого размножения на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней, и (iv) указанный способ включает проведение быстрого второго размножения на протяжении

периода, составляющего приблизительно 11 дней. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации осуществление этапов указанного способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001282] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что (i) указанный способ включает получение первой популяции TIL из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта, (ii) указанный способ включает проведение этапа культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3 дня, до проведения этапа подготовительного первого размножения, (iii) указанный способ включает проведение подготовительного первого размножения на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней, и (iv) указанный способ включает проведение быстрого второго размножения путем культивирования культуры второй популяции TIL в течение приблизительно 5 дней, разделение указанной культуры с получением до 5 субкультур и культивирование указанных субкультур в течение приблизительно 6 дней. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации каждую из $\leq$5 субкультур культивируют в контейнере, размер которого равен или превышает размер контейнера, в котором начинают культивирование второй популяции TIL при быстром втором размножении. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации культуру второй популяции TIL разделяют на равные части с получением до 5 субкультур. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации осуществление этапов указанного способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001283] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001284] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001285] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001286] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиоптатов, биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии или биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001287] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 20 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта.

[001288] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта.

[001289] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта.

[001290] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта.

[001291] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 20 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001292] в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким

образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 10 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001293] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001294] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от субъекта.

[001295] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 20 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от субъекта.

[001296] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 10 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от субъекта.

[001297] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от субъекта.

[001298] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от субъекта.

[001299] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от субъекта.

[001300] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую

популяцию TIL берут из 1 - приблизительно 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от субъекта.

[001301] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от субъекта.

[001302] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию TIL берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от субъекта.

[001303] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что (i) указанный способ включает взятие первой популяции TIL из 1 - приблизительно 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта, (ii) указанный способ включает проведение этапа культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3 дня, до проведения этапа подготовительного первого размножения, (iii) указанный способ включает проведение этапа подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL в культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК) на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней с получением второй популяции TIL, и (iv) указанный способ включает проведение быстрого второго размножения этап путем культивирования второй популяции TIL в культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, на протяжении периода, составляющего приблизительно 11 дней. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации осуществление этапов указанного способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001304] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что (i) указанный способ включает взятие первой популяции TIL из 1 - приблизительно 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта, (ii) указанный способ включает проведение этапа культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3 дня, до проведения этапа подготовительного первого размножения, (iii) указанный способ включает проведение этапа подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL в культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и

антигенпрезентирующие клетки (АПК), на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней, с получением второй популяции TIL, и (iv) указанный способ включает проведение быстрого второго размножения путем культивирования культуры второй популяции TIL в культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, в течение приблизительно 5 дней, разделение указанной культуры с получением до 5 субкультур и культивирование каждой из указанных субкультур в культуральной среде, содержащей ИЛ-2, в течение приблизительно 6 дней. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации каждую из ≤5 субкультур культивируют в контейнере, размер которого равен или превышает размер контейнера, в котором начинают культивирование второй популяции TIL при быстром втором размножении. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации культуру второй популяции TIL разделяют на равные части с получением до 5 субкультур. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации осуществление этапов указанного способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001305] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов для применения в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что (i) указанный способ включает взятие первой популяции TIL из 1 и до приблизительно 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от субъекта, (ii) указанный способ включает проведение этапа культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей 6000 МЕ ИЛ-2/мл в 0,5 л культуральной среды CM1 во флаконе G-Rex 100M на протяжении периода, составляющего приблизительно 3 дня, до проведения этапа подготовительного первого размножения, (iii) указанный способ включает проведение подготовительного первого размножения путем добавления 0,5 л культуральной среды CM1, содержащей 6000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и приблизительно 10^8 фидерных клеток, и культивирование на протяжении периода, составляющего приблизительно 8 дней, и (iv) указанный способ включает проведение быстрого второго размножения путем (a) переноса второй популяции TIL во флакон G-Rex 500MCS, содержащие 5 л культуральной среды CM2 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2, 30 нг/мл OKT-3 и 5×10^9 фидерных клеток, и культивирование в течение приблизительно 5 дней (b) разделение указанной культуры с получением до 5 субкультур путем переноса 10^9 TIL в каждый из до 5 флаконов G-Rex 500MCS, содержащих 5 л среды AIM-V с 3000 МЕ/мл ИЛ-2, и культивирование указанных субкультур в течение приблизительно 6 дней. Согласно некоторым вышеописанным вариантам реализации осуществление этапов указанного способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001306] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ размножения Т-клеток, включающий: (a) проведение подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток, взятых от донора, путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для подготовки активации первой популяции Т-клеток; (b) после того как активация первой популяции Т-клеток, подготовленных на этапе (a), начинает ослабевать,

проведение быстрого второго размножения первой популяции Т-клеток путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток для стимуляции роста и для стимуляции активации первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и (c) сбор второй популяции Т-клеток. Согласно другому варианту реализации указанный этап быстрого второго размножения разделяют на множество этапов для вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* в контейнер G-REX 500MCS, и культивирования первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры в культуре большего масштаба в указанном втором контейнере на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно другому варианту реализации этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй маломасштабной культуре на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно другому варианту реализации этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 4-7 дней. Согласно другому варианту реализации этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры

посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5 дней.

[001307] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры во второй контейнер, большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнер G-REX 500MCS, и культивирования первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры в культуре большего масштаба в указанном втором контейнере на протяжении периода, составляющего приблизительно 5-7 дней.

[001308] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в первой маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из первой маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами, равными по размеру первому контейнеру, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из первой маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют во второй маломасштабной культуре на протяжении периода, составляющего приблизительно 5-7 дней.

[001309] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 2-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5-7 дней.

[001310] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 5-6 дней.

[001311] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на

протяжении периода, составляющего приблизительно 5 дней.

[001312] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 6 дней.

[001313] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что этап быстрого размножения разделяют на множество этапов для горизонтального и вертикального масштабирования культуры посредством: (a) проведения быстрого второго размножения путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток в маломасштабной культуре в первом контейнере, *например,* в контейнере G-REX 100MCS, на протяжении периода, составляющего приблизительно 3-4 дня, и последующего (b) осуществления переноса и пропорционального перераспределения первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры между 2, 3 или 4 вторыми контейнерами большего размера, чем первый контейнер, *например,* контейнерами G-REX 500MCS, при этом в каждом из вторых контейнеров часть первой популяции Т-клеток из маломасштабной культуры, перенесенных в такой второй контейнер, культивируют в культуре большего масштаба на протяжении периода, составляющего приблизительно 7 дней.

[001314] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью до 7 дней.

[001315] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

[001316] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

[001317] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 10 дней.

[001318] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 11 дней.

[001319] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

[001320] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 10 дней.

[001321] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней или 8 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

[001322] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней или 8 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 10 дней.

[001323] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

[001324] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что подготовительное первое размножение на этапе (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней, и быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

[001325] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде, содержащей ОКТ-3 и ИЛ-2.

[001326] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, ОКТ-3 и ИЛ-2.

[001327] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001328] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001329] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде, содержащей ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001330] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что вторая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

[001331] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере,

содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), отличающуюся тем, что указанная первая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, причем на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и вторую популяцию АПК, отличающуюся тем, что указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и тем, что указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

[001332] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, ОКТ-3, ИЛ-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), отличающуюся тем, что указанная первая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, причем на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и вторую популяцию АПК, отличающуюся тем, что указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и тем, что указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

[001333] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), отличающуюся тем, что указанная первая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, причем на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, ОКТ-3, ИЛ-2 и вторую популяцию АПК, отличающуюся тем, что указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную вторую популяцию АПК наслаивают на первую

газопроницаемую поверхность, и тем, что указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

[001334] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, ИЛ-2 и первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), отличающуюся тем, что указанная первая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток и указанную первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, причем на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит агонист 4-1BB, OKT-3, ИЛ-2 и вторую популяцию АПК, отличающуюся тем, что указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донорной первой популяции Т-клеток, и указанную вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность, и тем, что указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

[001335] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение числа АПК во второй популяции АПК к количеству АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно 2:1.

[001336] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что число АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно $2{,}5\times10^{8}$ и число АПК во второй популяции АПК составляет приблизительно 5×10^{8}.

[001337] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине, составляющей 2 слоя АПК.

[001338] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК наслаивают на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине в диапазоне от 4 до 8 слоев АПК.

[001339] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (a), составляет 2:1.

[001340] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $4,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001341] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001342] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001343] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей точно или приблизительно $2,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001344] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001345] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001346] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001347] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей точно или приблизительно $4,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001348] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $4,5\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $7,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001349] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $1,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $3,5\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $6,0\times10^6$ АПК/см^2.

[001350] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $2,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $3,0\times10^6$ АПК/см^2, и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью в диапазоне от (точно или приблизительно) $4,0\times10^6$ АПК/см^2 до (точно или приблизительно) $5,5\times10^6$ АПК/см^2.

[001351] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что на этапе (a) первую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью, составляющей точно или приблизительно $2,0\times10^6$ АПК/см^2 и на этапе (b) вторую популяцию АПК высевают на первую газопроницаемую поверхность с плотностью,

составляющей точно или приблизительно $4{,}0\times10^6$ АПК/см^2.

[001352] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные АПК представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

[001353] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные МКПК облучены и являются экзогенными для донора первой популяции Т-клеток.

[001354] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

[001355] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (MIL).

[001356] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанные Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (ЛПК).

[001357] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают путем отделения от цельной крови донора.

[001358] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают путем отделения от продукта афереза от донора.

[001359] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток отделяют от цельной крови или продукта афереза, полученных от донора, с применением положительного или отрицательного отбора по фенотипу Т-клеток.

[001360] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что фенотип Т-клеток представлен CD3+ и CD45+.

[001361] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что до проведения подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток указанные Т-клетки отделяют от NK-клеток. Согласно другому варианту реализации указанные Т-клетки отделяют от NK-клеток в первой популяции Т-клеток путем удаления CD3- CD56+ клеток из первой популяции Т-клеток. Согласно другому варианту реализации указанные CD3- CD56+ клетки удаляют из первой популяции Т-клеток путем проведения сортировки клеток в первой популяции Т-клеток с применением стратегии гейтирования, позволяющей удалить фракцию CD3- CD56+ клеток и извлечь отрицательную фракцию. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в первой популяции Т-клеток, характеризующейся высоким процентом NK-клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в первой популяции Т-клеток, характеризующейся высоким процентом CD3- CD56+ клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в опухолевой ткани, характеризующейся присутствием значительного количества NK-клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в опухолевой ткани, характеризующейся значительным количеством CD3- CD56+ клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в опухолевой ткани, полученной от пациента, у которого имеется опухоль, характеризующаяся присутствием значительного количества NK-клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в опухолевой ткани, полученной от пациента, у которого имеется опухоль, характеризующаяся присутствием значительного количества CD3- CD56+ клеток. Согласно другому варианту реализации вышеуказанный способ используют для размножения Т-клеток в опухолевой ткани полученной от пациента, страдающего раком яичников.

[001362] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что точно или приблизительно 1×10^7 Т-клеток из первой популяции Т-клеток высевают в контейнер для инициации первичного первого размножения в культуре в таком контейнере.

[001363] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток распределяют по множества контейнеров, и в каждый контейнер высевают точно или приблизительно 1×10^7 Т-клеток из первой популяции Т-клеток для инициации первичного первого размножения в культуре в таком контейнере.

[001364] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что вторая популяция Т-

клеток, собранная на этапе (c), представляет собой терапевтическую популяцию TIL.

[001365] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиопсии, толстоигольной биопсии или тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001366] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиопсии, толстоигольной биопсии или тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001367] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиопсии, толстоигольной биопсии или тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001368] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиопсии, толстоигольной биопсии или тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001369] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию), трепанобиопсии, толстоигольной биопсии или тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001370] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из одного или более трепанобиоптатов опухолевой ткани от донора.

[001371] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-20 трепанобиоптатов опухолевой ткани от донора.

[001372] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от донора.

[001373] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 трепанобиоптатов опухолевой ткани от донора.

[001374] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 трепанобиоптатов опухолевой ткани от донора.

[001375] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из одного или более биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001376] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-20 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001377] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-10 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001378] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001379] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем тонкоигольной аспирации опухолевой ткани от донора.

[001380] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в

соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток получают из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от донора.

[001381] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от донора.

[001382] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от донора.

[001383] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от донора.

[001384] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем малой биопсии (включая, например, панч-биопсию) опухолевой ткани от донора.

[001385] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из одного или более биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от донора.

[001386] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-20 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от донора.

[001387] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1-10 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от донора.

[001388] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от донора.

[001389] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что первую популяцию Т-клеток берут из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 биоптатов, полученных путем толстоигольной биопсии опухолевой ткани от донора.

[001390] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: i) взятие и/или получение первой популяции TIL из образца опухоли, полученного из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии, трепанобиопсии или игольной биопсии опухоли от субъекта путем культивирования указанного образца опухоли в первой клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, в течение приблизительно 3 дней; (ii) проведение подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL во второй клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно 7 или 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL; (iii) проведение быстрого второго размножения путем добавления во вторую клеточную культуральную среду указанной второй популяции TIL дополнительных ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раза больше числа АПК добавленного на этапе (ii), причем указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 11 дней, с получением указанной третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, и указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область; (iv) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (iii); и (v) перенос собранной популяции TIL с этапа (iv) в пакет для инфузии.

[001391] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий: (i) взятие и/или получение первой популяции TIL из образца опухоли, полученного из одного или более биоптатов, полученных путем малой биопсии, трепанобиопсии или игольной биопсии опухоли от

субъекта путем культивирования указанного образца опухоли в первой клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2 в течение приблизительно 3 дней; (ii) проведение подготовительного первого размножения путем культивирования указанной первой популяции TIL во второй клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно 7 или 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL; (iii) проведение быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с третьей клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 11 дней, с получением указанной третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и (iv) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (iii).

[001392] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что после 5 дня второго периода культуру разделяют на 2 или более субкультур, и в каждую субкультуру добавляют дополнительное количество третьей культуральной среды и культивируют в течение приблизительно 6 дней.

[001393] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что после 5 дня второго периода культуру разделяют на 2 или более субкультур, и в каждую субкультуру добавляют четвертую культуральную среду, содержащую ИЛ-2, и культивируют в течение приблизительно 6 дней.

[001394] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что после 5 дня второго периода культуру разделяют на субкультуры, получая до 5 субкультур.

[001395] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ, описанный в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что все этапы способа завершают приблизительно за 22 дня.

[001396] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ размножения Т-клеток, включающий: (i) проведение подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток из образца опухоли, взятого из одного или более биоптатов опухоли, полученных от донора путем малой биопсии, трепанобиопсии или игольной биопсии, путем культивирования указанной

первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для подготовки активации первой популяции Т-клеток; (ii) после того как активация первой популяции Т-клеток, подготовленных на этапе (a), начинает ослабевать, проведение быстрого второго размножения первой популяции Т-клеток путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток для стимуляции роста и для стимуляции активации первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и (iv) сбор второй популяции Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный образец опухоли получают из множества трепанобиоптатов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество трепанобиоптатов выбрана из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 трепанобиоптатов.

Процессы получения TIL (варианты реализации процесса 2A со средой с определенным составом)

[001397] Пример процесса получения TIL, известный как процесс 2A, включающий некоторые из указанных признаков, представлен на фиг. 1A и 109 (такой процесс также описан в международной патентной публикации WO/2018/182817.

[001398] Как описано в настоящем документе, настоящее изобретение может включать этап, связанный с рестимуляцией криоконсервированных TIL для повышения их метаболической активности и, соответственно, относительного здоровья до трансплантации пациенту, а также способы тестирования их метаболического здоровья. Как в общих чертах изложено в настоящем документе, TIL обычно берут из образца пациента и производят манипуляции для увеличения их количества перед трансплантацией пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации с указанными TIL могут быть необязательно проведены генетические манипуляции согласно обсуждению ниже.

[001399] Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL могут быть криоконсервированы. После размораживания они могут быть также рестимулированы для повышения метаболизма перед инфузией пациенту.

[001400] Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение (в том числе процессы, называемые пре-REP, а также процессы, представленные на фиг. 109 как этап A) сокращают до 3-14 дней, а второе размножение (в том числе процессы, называемые REP, а также процессы, представленные на фиг. 109 как этап B) сокращают до 7-14 дней, согласно подробному описанию ниже, а также в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение (например, размножение, описанное как этап B на фиг. 109) сокращают до 11 дней, а второе размножение (например, размножение согласно описанию этапа D на фиг. 109) сокращают до 11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию первого размножения и второго размножения (например, размножение, описанное как этап B и этап D на фиг. 109) сокращают до 22 дней, как подробно описано ниже, а также в примерах и на чертежах.

[001401] Обозначения «этапов» A, B, C и т.п. ниже относятся к фиг. 109 и к определенным вариантам реализации, описанным в настоящем документе. Порядок

описанных ниже и на фиг. 109 этапов является иллюстративным; настоящим изобретением и способами согласно описанию в настоящем документе предусмотрены любые комбинации или порядок этапов, а также дополнительные этапы, повторение этапов и/или пропуск этапов.

ЭТАП А: Взятие образца опухоли пациента

[001402] В общем случае TIL исходно получают из образца опухоли пациента («первичные TIL»), а затем размножают в более многочисленную популяцию для дельнейших манипуляций согласно описанию в настоящем документе, необязательно криоконсервированную, рестимулированную согласно описанию в настоящем документе, необязательно с оценкой фенотипа и метаболических показателей в качестве индикаторов здоровья TIL.

[001403] Образец опухоли пациента может быть взят с применением способов, известных в данной области техники, обычно путем хирургической резекции, игольной биопсии или другого способа взятия образца, который содержит смесь опухолевых клеток и TIL. В общем случае образец опухоли может быть взят из любой солидной опухоли, в том числе первичных опухолей, инвазивных опухолей или метастатических опухолей. Образец опухоли может также представлять собой жидкую опухоль, такую как опухоль, полученную из злокачественного гематологического образования. Солидная опухоль может относиться к раку любого типа, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, раку молочной железы, поджелудочной железы, предстательной железы, ободочной и прямой кишки, легкого, головного мозга, почек, желудка и кожи (в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, плоскоклеточной карциноме, базально-клеточной карциноме и меланоме). Согласно некоторым вариантам реализации подходящие TIL получают из опухолей злокачественной меланомы, поскольку они содержат, по имеющимся данным, особенно высокие уровни TIL.

[001404] Термин «солидная опухоль» относится к аномальному тканевому образованию, которое обычно не включает кисты или жидкие области. Солидные опухоли могут быть доброкачественными или злокачественными. Термин «рак в виде солидной опухоли» относится к злокачественным, неопластическим или раковым солидным опухолям. Рак в виде солидной опухоли включает, не ограничиваясь перечисленным, саркомы, карциномы и лимфомы, такие как рак легкого, рака молочной железы, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом, рак предстательной железы, ободочной кишки, прямой кишки и мочевого пузыря. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак выбран из рака шейки матки, рака головы и шеи (включая, например, плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластому, рак яичников, саркому, рак поджелудочной железы, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак молочной железы с тройным негативным фенотипом и немелкоклеточную карциному легкого. Тканевая структура солидных опухолей включает взаимозависимые тканевые компартменты, включающие паренхиму (раковые клетки) и поддерживающие стромальные клетки, в которых рассредоточены раковые клетки и которые могут

обеспечивать поддерживающее микроокружение.

[001405] Термин «злокачественное гематологическое заболевание» относится к раку и опухолям гематопоэтических и лимфоидных тканей млекопитающих, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, тканей крови, костного мозга, лимфатических узлов и лимфатической системы. Гематологические злокачественные заболевания также называют «жидкими опухолями». Гематологические злокачественные заболевания включают, не ограничивая перечисленными, острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ), хроническую лимфоцитарную лимфому (ХЛЛ), мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому (МЛЛ), острый миелогенный лейкоз (АМЛ), хронический миелогенный лейкоз (ХМЛ), острый моноцитарный лейкоз (ОМЛ), лимфому Ходжкина и неходжкинские лимфомы. Термин «В-клеточное злокачественное гематологическое заболевание» относится к гематологическим злокачественным заболеваниям, поражающим В-клетки.

[001406] После взятия образец опухоли обычно фрагментируют посредством острой диссекции на небольшие кусочки размером от 1 до приблизительно 8 $мм^3$, в частности, хорошо подходят кусочки размером приблизительно 2-3 $мм^3$. TIL культивируют из указанных фрагментов, используя продукты ферментативного расщепления опухоли. Такие продукты расщепления опухоли могут быть получены путем инкубации в ферментативных средах (*например,* в буфере мемориального института Розуэлл Парк (RPMI) 1640, с 2 мМ глутаматом, 10 мкг/мл гентамицина, 30 единиц/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы) с последующей механической диссоциацией (*например,* с использованием устройства для диссоциации тканей). Продукты расщепления опухоли могут быть получены путем помещения опухоли в в ферментативные среды и механической диссоциации опухоли в течение приблизительно 1 минуты, с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, с последующими многократными циклами механической диссоциации и инкубации в вышеуказанных условиях, пока не останутся только небольшие кусочки ткани. В конце указанного процесса, если суспензия клеток содержит значительное число эритроцитов или мертвых клеток, для удаления указанных клеток может быть выполнено разделение в градиенте плотности с использованием разветвленного гидрофильного полисахарида FICOLL. Могут применяться альтернативные способы, известные в данной области техники, такие как описанные в опубликованной заявке на патент США № 2012/0244133 A1, содержание которой включено посредством ссылки в настоящий документ. Любые из вышеперечисленных способов могут применяться в любом из вариантов реализации, описанных в настоящем документе, для способов размножения TIL или способов лечения рака.

[001407] В общем случае собранная суспензия клеток называется «популяцией первичных клеток» или популяцией «свежесобранных» клеток.

[001408] Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация включает физическую фрагментацию, в том числе например, диссекцию, а также расщепление. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация представляет собой

физическую фрагментацию. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация представляет собой диссекцию. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментацию осуществляют путем расщепления. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть исходно культивированы из продуктов ферментативного расщепления опухоли и фрагментов опухоли, полученных от пациентов. Согласно варианту реализации TIL могут быть исходно культивированы из продуктов ферментативного расщепления опухоли и фрагментов опухоли, полученных от пациентов.

[001409] Согласно некоторым вариантам реализации в тех случаях, когда опухоль представляет собой солидную опухоль, указанную опухоль подвергают физической фрагментации после взятия образца опухоли, например, на этапе A (согласно фиг. 109). Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит до криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит после криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации фрагментация происходит после взятия опухоли и без какой-либо криоконсервации. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 10, 20, 30, 40 или более фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 30 или 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации опухоль фрагментируют, и 40 фрагментов или кусочков помещают в каждый контейнер для первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации множество фрагментов содержат от приблизительно 4 до приблизительно 50 фрагментов, причем каждый фрагмент имеет объем, составляющий приблизительно 27 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит от приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом, составляющим от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общим объемом, составляющим приблизительно 1350 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общей массой, составляющей от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов. Согласно некоторым вариантам реализации множество фрагментов содержит приблизительно 4 фрагмента.

[001410] Согласно некоторым вариантам реализации TIL получают из фрагментов опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации фрагмент опухоли получают путем острой диссекции. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 8 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 1 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 2 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 3 $мм^3$. Согласно некоторым

вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 4 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 5 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 6 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 7 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 8 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 9 мм^3. Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно 10 мм^3.

[001411] Согласно некоторым вариантам реализации TIL получают из продуктов расщепления опухоли. Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли получали путем инкубации в ферментативной среде, например, но не ограничиваясь перечисленным, RPMI 1640, 2 мМ GlutaMAX, 10 мг/мл гентамицина, 30 Ед/мл ДНКазы и 1,0 мг/мл коллагеназы, с последующей механической диссоциацией (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Оберн, Калифорния). После помещения опухоли в ферментативную среду указанная опухоль может быть механически диссоциирована в течение приблизительно 1 минуты. После этого раствор может инкубирован в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2, а затем повторно механически измельчен в течение приблизительно 1 минуты. После повторной инкубации в течение 30 минут при 37°C в 5% CO_2опухоль может быть механически измельчена в третий раз в течение приблизительно 1 минуты. Согласно некоторым вариантам реализации после третьего механического разрушения при наличии кусочков ткани большого размера образец 1 или 2 раза дополнительно подвергали механической диссоциации с дополнительными 30 минутами инкубации при 37°C в 5% CO_2 либо без дополнительной инкубации. Согласно некоторым вариантам реализации в конце последней инкубации, если суспензия клеток содержит значительное число эритроцитов или мертвых клеток, для удаления указанных клеток может быть выполнено разделение в градиенте плотности с использованием Ficoll.

[001412] В общем случае собранная суспензия клеток называется «популяцией первичных клеток» или популяцией «свежесобранных» клеток.

[001413] Согласно некоторым вариантам реализации клетки могут быть необязательно заморожены после сбора образцов и могут храниться в замороженном виде до начала описанного размножения на этапе B, который подробнее описан ниже, а также проиллюстрирован на фиг. 109.

ЭТАП B: первое размножение

1. Молодые TIL

[001414] Согласно некоторым вариантам реализации предложенные способы обеспечивают получение молодых TIL, которые способны проходить больше циклов репликации после введения субъекту/пациенту и таким образом могут обеспечивать дополнительные благоприятные терапевтические эффекты по сравнению с более старыми TIL (*m.e.* TIL, прошедшими больше циклов репликации до введения субъекту/пациенту).

Характеристики молодых TIL были описаны в опубликованных источниках, например, Donia, at al., Scandinavian Journal of Immunology, 75:157-167 (2012); Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., J Immunother, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., Clin Cancer Res, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009); Robbins, et al., J Immunol 2004; 173:7125-7130; Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); и Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008), все из которых включены в настоящий документ полностью посредством ссылок.

[001415] Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются благодаря соматической рекомбинации ограниченного, но значительного количества генных сегментов. Указанные генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразие), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующее применение иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Согласно настоящему изобретению предложен способ получения TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток по сравнению со свежесобранными TIL и/или TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, в том числе, например, способов, не представленных на фиг. 109. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при первом размножении, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанное увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к тяжелой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к легкой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к Т-клеточному рецептору. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к одному из Т-клеточных рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии TCRab (*m.e.* TCRα/β).

[001416] После диссекции или расщепления фрагментов опухоли, например, согласно описанию этапа A на фиг. 109, полученные клетки культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, способствующих росту TIL, а не опухолевых и других клеток. Согласно некоторым вариантам реализации продукты расщепления опухоли

инкубируют в лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную AB сыворотку человека с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода нескольких дней, обычно от 3 до 14 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего 7-14 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего 10-14 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего приблизительно 11 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL.

[001417] Согласно предпочтительному варианту реализации размножение TIL может быть проведено путем осуществления начального этапа размножения смешанных TIL (например, согласно описанию этапа B на фиг. 109, который может включать процессы, называемые пре-REP) согласно приведенному здесь и ниже описанию, с последующим вторым размножением (этап D, включая процессы, называемые этапами протокола быстрого размножения (REP)) согласно приведенному ниже описанию этапа D и в тексте настоящего документа, с последующей необязательной криоконсервацией, и с последующим вторым этапом D (включая процессы, называемые этапами рестимуляции REP) согласно приведенному здесь и ниже описанию. TIL, полученные в результате указанного процесса, могут быть необязательно охарактеризованы в отношении фенотипических характеристик и метаболических показателей согласно описанию в настоящем документе.

[001418] Согласно вариантам реализации, когда культивирование TIL инициируют в 24-луночных планшетах, например, с применением плоскодонного 24-луночного кластера для клеточных культур Costar (Corning Incorporated, Corning, NY), в каждую лунку могут быть засеяны 1×10^6 клеток из продукта расщепления опухоли, или один фрагмент опухоли в 2 мл полной среды (CM) с ИЛ-2 (6000 МЕ/мл; Chiron Corp., Эмеривилл, Калифорния). Согласно некоторым вариантам реализации размер фрагмента опухоли составляет приблизительно от 1 $мм^3$ до 10 $мм^3$.

[001419] Согласно некоторым вариантам реализации культуральную среду для первого размножения сокращенно называют «CM», от «culture media», т.е. «культуральная среда». В некоторых вариантах реализации CM для стадии B состоит из RPMI 1640 с GlutaMAX, дополненной 10% сывороткой AB человека, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. Согласно вариантам реализации, когда культивирование начинают в газопроницаемых флаконах объемом 40 мл и газопроницаемым кремниевым дном площадью 10 $см^2$ (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон,

Миннесота) (фиг. 1), в каждый флакон загружали 10-40 × 10^6 жизнеспособных клеток из продукта расщепления опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл СМ с ИЛ-2. И G-Rex10, и 24-луночные планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C в 5% CO_2; через 5 дней после инициации культуры половину среду убирали и заменяли на свежую СМ с ИЛ-2, и после 5 дня каждые 2-3 дня половину среды заменяли.

[001420] После получения фрагментов опухоли, полученные клетки (*m.e.* фрагменты) культивируют в сыворотке, содержащей ИЛ-2, в условиях, благоприятствующих росту TIL, а не опухолевых и других клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанные продукты расщепления опухоли инкубируют лунках объемом 2 мл в среде, содержащей инактивированную АВ сыворотку человека (или, в некоторых случаях, как описано в настоящем документе, в присутствии популяции клеток иАПК) с 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Указанную первичную популяцию клеток культивируют на протяжении периода, составляющего дней, обычно от 10 до 14 дней, с получением смешанной популяции TIL, обычно содержащей приблизительно 1×10^8 смешанных клеток TIL. Согласно некоторым вариантам реализации ростовая среда при первом размножении содержит ИЛ-2 или его вариант. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ИЛ представляет собой рекомбинантный ИЛ-2 человека (рчИЛ-2). Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 20-30×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 20×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 25×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 обладает специфической активностью 30×10^6 МЕ/мг на сосуд с 1 мг. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 4-8×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 5-7×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации стоковый раствор ИЛ-2 имеет конечную концентрацию 6×10^6 МЕ/мг ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанный стоковый раствор ИЛ-2 готовят согласно описанию в примере 4. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 10000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 9000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 7000 МЕ/мл ИЛ-2, приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2 или приблизительно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 9000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 7000 МЕ/мл ИЛ-2 до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 6000

МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001421] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 160 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 140 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 120 МЕ/мл ИЛ-15 или приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 500 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 400 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно от 300 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-15. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15.

[001422] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 4 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 3 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит от приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации

культуральная среда для первого размножения содержит от приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит от приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит от приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит от приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения содержит приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-21. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21.

[001423] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для первого размножения сокращенно называется «СМ», от «culture media» - «культуральная среда». Согласно некоторым вариантам реализации среда называется «СМ1» (культуральная среда 1). В некоторых вариантах реализации СМ состоит RPMI 1640 с GlutaMAX, с добавлением 10% сыворотки АВ человека, 25 мМ Hepes и 10 мг/мл гентамицина. Согласно вариантам реализации, когда культивирование начинают в газопроницаемых флаконах объемом 40 мл с газопроницаемым кремниевым дном площадью 10 $см^2$ (например, G-Rex10; Wilson Wolf Manufacturing, Нью-Брайтон, Миннесота) (фиг. 1), в каждый флакон загружали 10-40х 10^6 жизнеспособных клеток из продукта расщепления опухоли или 5-30 фрагментов опухоли в 10-40 мл СМ с ИЛ-2. И G-Rex10, и 24-луночные планшеты инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°С в 5% CO_2; через 5 дней после инициации культуры половину среду убирали и заменяли на свежую СМ с ИЛ-2, и после 5 дня каждые 2-3 дня половину среды заменяли. Согласно некоторым вариантам реализации указанная СМ представляет собой СМ1, описанную в примерах, см. пример 5. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение происходит в исходной клеточной культуральной среде или в первой клеточной культуральной среде. Согласно некоторым вариантам реализации указанная исходная клеточная культуральная среда или первая клеточная культуральная среда содержит ИЛ-2.

[001424] Согласно некоторым вариантам реализации процесс первого размножения (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа В на фиг. 109, которые могут включать процессы, иногда называемые пре-REP) сокращают до 3-14 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение (в том числе такие процессы, как, например, описанные для этапа В на фиг. 109, которые могут включать процессы, иногда называемые пре-REP) сокращают до 7-14 дней, согласно описанию в примерах и на фиг. 4 и 5, а также в том числе,

например, размножение согласно описанию этапа B на фиг. 109. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение на этапе B сокращают до 10-14 дней, согласно описанию в примерах и на фиг. 4 и 5. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение сокращают до 11 дней, в том числе, например, размножение согласно описанию этапа B на фиг. 109.

[001425] Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться 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. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 3-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 4-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 5-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 6-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 7-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 8-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 9-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 10-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 11-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 12-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 13-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 1-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 3-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 4-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 5-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 6-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 7-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 8-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 9-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 10-11 дней. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться в течение 11 дней.

[001426] Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21 используют в качестве комбинации во время первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены во время первого размножения, в том числе например, в ходе процессов этапа B в соответствии с фиг. 109, а также согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 используют в качестве комбинации во время первого размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-15, и ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены в ходе процессов этапа B в соответствии с фиг. 109 и согласно описанию в настоящем документе.

[001427] Согласно некоторым вариантам реализации процесс первого размножения (в том числе процессы, называемые пре-REP; например, этап B в соответствии с фиг. 109) сокращают до 3-14 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение этапа B сокращают до 7-14 дней, согласно описанию в примерах и на фиг. 4 и 5. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение этапа B сокращают до 10-14 дней, согласно описанию в примерах и на фиг. 4, 5, и 27. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение сокращают до 11 дней.

[001428] Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение, например, этап B в соответствии с фиг. 109, осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный единственный используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор с закрытой системой представляет собой единственный биореактор.

ЭТАП C: переход от первого размножения к второму размножению

[001429] В некоторых случаях смешанная популяция TIL, полученная путем первого размножения, в том числе, например, популяция TIL, полученная, например, на этапе B как описано на фиг. 109, может быть немедленно криоконсервирована с применением протоколов, описанных в настоящем документе ниже. Как вариант, популяция TIL, полученная путем первого размножения, называемая второй популяцией TIL, может быть подвергнута второму размножению (которое может включать размножение, иногда называемое REP), а затем криоконсервирована согласно описанию ниже. Аналогичным образом, в том случае, если генетически модифицированные TIL будут использованы в терапии, первая популяция TIL (иногда называемая смешанной популяцией TIL) или вторая популяция TIL (которая может, согласно некоторым вариантам реализации, включать популяцию, называемую популяцией REP TIL) может быть подвергнута генетическим модификациям для подходящей обработки до

размножения, или после первого размножения и до второго размножения.

[001430] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при первом размножении (например, на этапе B, как показано на фиг. 109), сохраняют до фенотипирования для отбора. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при первом размножении (например, на этапе B, как показано на фиг. 109) не помещают на хранение, и переходят непосредственно к их второму размножению. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при первом размножении, не криоконсервируют после указанного первого размножения и до второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно 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 проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 3-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 4-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 4-10 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 7-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит приблизительно через 14 дней после проведения фрагментации.

[001431] Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 1-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации первое размножение TIL может продолжаться на протяжении 2-14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 3-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 4-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 5-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 6-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 7-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению

происходит через 8-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 9-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 10-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 11-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 12-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 13-14 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 14 днейпосле проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 1-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 2-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 3-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 4-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 5-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 6-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 7-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 8-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 9-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 10-11 дней после проведения фрагментации. Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению происходит через 11 дней после проведения фрагментации.

[001432] Согласно некоторым вариантам реализации TIL не помещают на хранение после первого размножения и до второго размножения, и переводят указанные TIL непосредственно к второму размножению (например, согласно некоторым вариантам реализации отсутствует хранение при переходе с этапа B к этапу D, как показано на фиг. 109). Согласно некоторым вариантам реализации указанный переход происходит в

закрытой системе согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации после первого размножения TIL вторую популяцию TIL переводят непосредственно к второму размножению без переходного периода.

[001433] Согласно некоторым вариантам реализации переход от первого размножения к второму размножению, например, этапу C в соответствии с фиг. 109, осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный единственный используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор с закрытой системой представляет собой единственный биореактор.

[001434] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в процессах размножения согласно описанию в настоящем документе, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом применяют для предотвращения и/или уменьшения экспериментальной изменчивости, частично обусловленной изменчивостью содержащих сыворотку сред от партии к партии.

[001435] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими: CTS™ OpTmizer™ Базальная среда для увеличения Т-клеток, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальная необходимая среда (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательную среду RPMI и модифицированную Исковым среду Дульбекко.

[001436] Согласно некоторым вариантам реализации сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки CTS™ OpTmizer, заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одну или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или

более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[001437] Согласно некоторым вариантам реализации заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement применяют со стандартными ростовыми средами, включая, но не ограничиваясь перечисленными, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, CST™ AIM-V SFM, среду для размножения Т-клеток без ксеногенных компонентов LymphoONE™, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по Искову.

[001438] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки (% об.) в указанной бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[001439] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion SFM, ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR)

(ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ.

[001440] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-

клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001441] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или 4 мМ до приблизительно 5 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[001442] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[001443] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в международной PCT-публикации WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для применения согласно настоящему изобретению. В указанной публикации описана бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток. Указанная бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток включает базальную клеточную культуральную среду с добавлением бессывороточной добавки, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной культуральной среды для эукариотических клеток содержит или получена путем комбинирования одного или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более

альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более следовых элементов, и одного или более антибиотиков. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин или заменитель альбумина и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), ростовой среды RPMI и среды Дульбекко, модифицированной Исковым.

[001444] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация глицина в среде с определенным составом находится в диапазоне от приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-гистидина составляет приблизительно 5-250 мг/л, концентрация L-изолейцина составляет приблизительно 5-300 мг/л, концентрация L-метионина составляет приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-фенилаланина составляет приблизительно 5-400 мг/л, концентрация L-пролина составляет приблизительно 1-1000 мг/л, концентрация L- гидроксипролина составляет приблизительно 1-45 мг/л, концентрация L-серина составляет приблизительно 1-250 мг/л, концентрация L-треонина составляет приблизительно 10-500 мг/л, концентрация L-триптофана составляет приблизительно 2-110 мг/л, концентрация L-тирозина составляет приблизительно 3-175 мг/л, концентрация L-валина составляет приблизительно 5-500 мг/л, концентрация тиамина составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация восстановленного глутатиона составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация L-аскорбиновая кислота-2-фосфата составляет приблизительно 1-200 мг/л, концентрация насыщенного железом трансферрина составляет приблизительно 1-50 мг/л, концентрация инсулина составляет приблизительно 1-100 мг/л, концентрация селенита натрия составляет приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л, и

концентрация альбумина (например, AlbuMAX® I) составляет приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[001445] Согласно некоторым вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в IX среде» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в конечных концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации IX среды» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанная бессывороточная добавка содержит не содержащие следовых элементов ингредиенты, типы и концентрации которых указаны в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации добавки» в таблице A ниже.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, не содержащих следовых элементов

Ингредиент	Предпочтительный вариант реализации добавки (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в IX среде (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант реализации в IX среде (мг/л) (Приблизительно)
Глицин	150	5-200	53
L-Гистидин	940	5-250	183
L-Изолейцин	3400	5-300	615
L-Метионин	90	5-200	44
L-Фенилаланин	1800	5-400	336
L-Пролин	4000	1-1000	600
L-Гидроксипролин	100	1-45	15
L-Серин	800	1-250	162
L-Треонин	2200	10-500	425
L-Триптофан	440	2-110	82
L-Тирозин	77	3-175	84
L-Валин	2400	5-500	454
Тиамин	33	1-20	9
восстановленный глутатион	10	1-20	1,5
Аскорбиновая кислота-2-PO_4	330	1-200	50

(Соль Mg)			
Трансферрин (насыщенный железом)	55	1-50	8
Инсулин	100	1-100	10
Селенит натрия	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83 000	5000-50 000	12 500

[001446] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанная осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации в среду с определенным составом добавляют до приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия. В указанную среду с определенным составом может быть дополнительно добавлен L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ), 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[001447] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в источнике: Smith, et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31), подходят для применения согласно настоящему изобретению. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды, и добавляли 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[001448] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры, необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известный как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

ЭТАП D: Второе размножение

[001449] Согласно некоторым вариантам реализации популяцию клеток TIL размножают после сбора и начальной массовой обработки, например, после этапа A и этапа B, и перехода, называемого этапом C, как указано на фиг. 109). Указанное дальнейшее размножение называют в настоящем документе вторым размножением, и оно может включать процессы размножения, обычно называемые в данной области техники процессом быстрого размножения (REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 109). Второе размножение обычно осуществляют с применением культуральной среды, содержащей ряд компонентов, в том числе фидерные клетки, источник цитокина и

антитело против CD3, в газопроницаемом контейнере.

[001450] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение или второе размножение TIL (которое может включать размножение, иногда называемое REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 109) может быть проведено с применением любых флаконов или контейнеров для TIL, известных специалистам в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней или 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 7 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 8 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 9 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 10 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 11 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение приблизительно 12 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 13 дней до приблизительно 14 дней. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение TIL может продолжаться в течение от приблизительно 14 дней.

[001451] Согласно варианту реализации второе размножение может быть проведено в газопроницаемом контейнере с применением способов согласно настоящему описанию (в том числе например, размножение, называемое REP; а также процессы, показанные для этапа D на фиг. 109). Например, TIL могут быть быстро размножены с применением неспецифической стимуляции Т-клеточных рецепторов в присутствии интерлейкина-2 (ИЛ-2) или интерлейкина-15 (ИЛ-15). Указанный неспецифический стимул для Т-клеточного рецептора может включать, например, антитело против CD3, например, приблизительно 30 нг/мл OKT3, моноклональное антитело мыши против CD3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси, или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния) или UHCT-1 (коммерчески доступное от BioLegend, Сан-Диего, Калифорния, США). TIL могут быть размножены для индукции дальнейшей стимуляции TIL in vitro посредством включения одного или более антигенов в ходе второго размножения, в том числе их антигенных частей, таких как эпитоп(ы), рака, которые могут необязательно экспрессироваться с вектора, такого как связывающий лейкоцитарный антиген человека А2 (HLA-A2) пептид, *например,* 0,3 мкМ MART-1:26-35 (27 л) или gpl 00:209-217 (210M), необязательно в присутствии фактора роста Т-клеток, такого как 300 МЕ/мл ИЛ-2 или ИЛ-15. Другие подходящие антигены могут включать, *например,* NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, раковый антиген тирозиназу, MAGE-A3, SSX-2 и

VEGFR2, или их антигенные части. TIL могут также быть быстро размножены посредством рестимуляции тем же антигеном (антигенами) рака, которым(и) сенсибилизируют HLA-A2-экспрессирующие антигенпрезентирующие клетки. Как вариант, TIL можно дополнительно рестимулировать, например, облученными аутологичными лимфоцитами или облученными аллогенными HLA-A2+ лимфоцитами и ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации рестимуляция происходит в рамках второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в присутствии облученных аутологичных лимфоцитов или облученных HLA-A2+ аллогенных лимфоцитов и ИЛ-2.

[001452] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1000 МЕ/мл, приблизительно 1500 МЕ/мл, приблизительно 2000 МЕ/мл, приблизительно 2500 МЕ/мл, приблизительно 3000 МЕ/мл, приблизительно 3500 МЕ/мл, приблизительно 4000 МЕ/мл, приблизительно 4500 МЕ/мл, приблизительно 5000 МЕ/мл, приблизительно 5500 МЕ/мл, приблизительно 6000 МЕ/мл, приблизительно 6500 МЕ/мл, приблизительно 7000 МЕ/мл, приблизительно 7500 МЕ/мл или приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 1000 до 2000 МЕ/мл, от 2000 до 3000 МЕ/мл, от 3000 до 4000 МЕ/мл, от 4000 до 5000 МЕ/мл, от 5000 до 6000 МЕ/мл, от 6000 до 7000 МЕ/мл, от 7000 до 8000 МЕ/мл или от 8000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001453] Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит антитело OKT3. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 30 нг/мл антитела OKT3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,1 нг/мл, приблизительно 0,5 нг/мл, приблизительно 1 нг/мл, приблизительно 2,5 нг/мл, приблизительно 5 нг/мл, приблизительно 7,5 нг/мл, приблизительно 10 нг/мл, приблизительно 15 нг/мл, приблизительно 20 нг/мл, приблизительно 25 нг/мл, приблизительно 30 нг/мл, приблизительно 35 нг/мл, приблизительно 40 нг/мл, приблизительно 50 нг/мл, приблизительно 60 нг/мл, приблизительно 70 нг/мл, приблизительно 80 нг/мл, приблизительно 90 нг/мл, приблизительно 100 нг/мл, приблизительно 200 нг/мл, приблизительно 500 нг/мл, и приблизительно 1 мкг/мл антитела OKT3. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда содержит от 0,1 нг/мл до 1 нг/мл, от 1 нг/мл до 5 нг/мл, от 5 нг/мл до 10 нг/мл, от 10 нг/мл до 20 нг/мл, от 20 нг/мл до 30 нг/мл, от 30 нг/мл до 40 нг/мл, от 40 нг/мл до 50 нг/мл, и от 50 нг/мл до 100 нг/мл антитела OKT3.

[001454] Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21 используют в качестве комбинации в ходе второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-7, ИЛ-15 и/или ИЛ-21, а также любые их комбинации могут быть включены в ходе второго размножения, в том числе, например, в процессы этапа D в соответствии с фиг. 109, а также описанные в настоящем документе.

Согласно некоторым вариантам реализации комбинацию ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 используют в качестве комбинации в ходе второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 а также любые их комбинации могут быть включены в процессы этапа D в соответствии с фиг. 109 и согласно описанию в настоящем документе.

[001455] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение может быть проведено в клеточной культуральной среде с добавками, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в клеточной культуральной среде с добавками. Согласно некоторым вариантам реализации указанная клеточная культуральная среда с добавками содержит ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно некоторым вариантам реализации вторая клеточная культуральная среда содержит ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК; также называемые антигенпрезентирующими фидерными клетками). Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение происходит в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки (*т.е.* антигенпрезентирующие клетки).

[001456] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 160 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 140 МЕ/мл ИЛ-15, приблизительно 120 МЕ/мл ИЛ-15 или приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 500 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 400 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 300 МЕ/мл ИЛ-15 до приблизительно 100 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 200 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-15. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 180 МЕ/мл ИЛ-15.

[001457] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 20 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 4 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 3 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21, приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21 или приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 20 МЕ/мл

ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 15 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 12 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 10 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит от приблизительно 5 МЕ/мл ИЛ-21 до приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда для второго размножения содержит приблизительно 2 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно некоторым вариантам реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 0,5 МЕ/мл ИЛ-21. Согласно варианту реализации клеточная культуральная среда дополнительно содержит ИЛ-21. Согласно предпочтительному варианту реализации клеточная культуральная среда содержит приблизительно 1 МЕ/мл ИЛ-21.

[001458] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК) представляют собой МКПК. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК и/или антигенпрезентирующим клеткам при быстром размножении и/или втором размножении составляет приблизительно от 1 до 25, приблизительно от 1 до 50, приблизительно от 1 до 100, приблизительно от 1 до 125, приблизительно от 1 до 150, приблизительно от 1 до 175, приблизительно от 1 до 200, приблизительно от 1 до 225, приблизительно от 1 до 250, приблизительно от 1 до 275, приблизительно от 1 до 300, приблизительно от 1 до 325, приблизительно от 1 до 350, приблизительно от 1 до 375, приблизительно от 1 до 400 или приблизительно от 1 до 500. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК при быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 к 50 и до 1 к 300. Согласно варианту реализации отношение TIL к МКПК при быстром размножении и/или втором размножении составляет от 1 к 100 и до 1 к 200.

[001459] В одном из вариантов осуществления REP и/или второе размножение проводят в колбах, где основная масса TIL смешивается со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30 мг/мл антитела против CD3 OKT3 и 3000 МЕ/мл IL. -2 в 150 мл среды. Замену среды проводят (обычно заменяют 2/3 среды путем аспирации 2/3 отработанной среды и замены равным объемом свежей среды) до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную ростовую камеру Альтернативные ростовые камеры включают флаконы G-REX и газопроницаемые контейнеры, более подробно описанные ниже.

[001460] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение (которое может включать процессы, называемые процессом REP) сокращают до 7-14 дней, согласно описанию в примерах и на чертежах. Согласно некоторым вариантам реализации

второе размножение сокращают до 11 дней.

[001461] Согласно варианту реализации REP и/или второе размножение может быть проведено с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых пакетов согласно имеющемуся описанию (Tran, et al., J. Immunother. **2008,** 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. **2003,** 26, 332-42), или газопроницаемой посуды для культивирования (флаконы G-Rex). Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение (в том числе называемое быстрым размножением) осуществляют во флаконах T-175, и приблизительно 1×10^6 TIL, суспендированных в 150 мл среды, может быть добавлено в каждый флакон T-175. TIL могут быть культивированы в смеси 1: 1 CM и среды AIM-V с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и 30 нг/мл антитела против CD3. Флаконы T-175 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO_2. Половина среды может быть заменена на 5 день на среду 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации на 7 день клетки из двух флаконов T-175 могут быть объединены в пакете объемом 3 л; и к 300 мл суспензии TIL 300 мл может быть добавлена AIM V с 5% AB сыворотки человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Количество клеток в каждом пакете подсчитывали каждый день или через день, и добавляли свежую среду, чтобы поддерживать количество клеток от 0,5 до $2,0\times10^6$ клеток/мл.

[001462] В одном варианте осуществления второе расширение (которое может включать расширения, называемые REP, а также расширения, указанные на этапе D на фиг. 109), может быть выполнено в газопроницаемых колбах вместимостью 500 мл с газопроницаемыми кремниевыми днищами 100 см (G -Rex 100, коммерчески доступный от Wilson Wolf Manufacturing Corporation, Нью-Брайтон, Миннесота, США), 5×10^6 или 10×10^6 TIL можно культивировать с PBMC в 400 мл среды 50/50 с добавлением 5% человеческого AB. сыворотка, 3000 МЕ на мл ИЛ-2 и 30 нг на мл анти-CD3 (OKT3). Флаконы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO_2. На 5 день 250 мл супернатанта могут быть извлечены, помещены в центрифужные флаконы и центрифугированы при 1500 об/мин (491 × g) в течение 10 минут. Клеточный осадок TIL может быть ресуспендирован с 150 мл свежей среды с 5% AB сыворотки человека, 3000 МЕ/мл ИЛ-2, и возвращен в исходные флаконы G-Rex 100. Если TIL последовательно размножают во флаконах G-Rex 100, на 7 день TIL в каждом G-Rex 100 могут быть суспендированы в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и указанная суспензия клеток может быть разделена на 3 x 100 мл аликвоты, которые могут быть использованы для посева в 3 флакона G-Rex 100. Затем в каждый флакон может быть добавлено по 150 мл AIM-V с 5% AB сыворотки человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Флаконы G-Rex 100 могут быть инкубированы при 37°C в 5% CO_2 и через 4 дня по 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл ИЛ-2 могут быть добавлены в каждый флакон G-REX 100. Клетки могут быть собраны на 14 день в культуре.

[001463] В одном из вариантов осуществления второе размножение (включая разложения, называемые REP) проводят в колбах, при этом основная масса TIL смешивается со 100- или 200-кратным избытком инактивированных питающих клеток, 30

мг/мл антитела к CD3 OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в 150 мл среды. Согласно некоторым вариантам реализации замену среды проводят до тех пор, пока клетки не переносят в альтернативную ростовую камеру. Согласно некоторым вариантам реализации проводят замену 2/3 среды путем аспирации среды и замены свежей средой. Согласно некоторым вариантам реализации альтернативные ростовые камеры включают флаконы G-REX и газопроницаемом контейнеры, как подробнее описано ниже.

[001464] Согласно варианту реализации осуществляют второе размножение (в том числе размножение, называемое REP), которое дополнительно включает этап, на котором отбирают TIL с улучшенной реактивностью в отношении опухолей. Может быть использован любой метод отбора, известный в данной области техники. Например, способы, описанные в опубликованной заявке на патент США № 2016/0010058 A1, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки, могут использоваться для выбора TIL с улучшенной реактивностью в отношении опухоли.

[001465] Необязательно, после быстрого второго размножения (в том числе размножения, называемого размножением REP) может быть выполнен анализ жизнеспособности клеток с применением стандартных анализов, известных в данной области техники. Например, на образце смешанных TIL может быть проведен анализ вытеснения трипанового синего, который избирательно помечает мертвые клетки и позволяет оценить жизнеспособность Согласно некоторым вариантам реализации в образцах TIL могут быть подсчитаны клетки и определена их жизнеспособность с использованием автоматизированного счетчика клеток Cellometer K2 (Nexcelom Bioscience, Лоуренс, Массачусетс). Согласно некоторым вариантам реализации жизнеспособность определяют в соответствии с протоколом счетчика клеток Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter, описанным, например, в примере 15.

[001466] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение (в том числе размножение, называемое REP) TIL может быть проведено с использованием флаконов T-175 и газопроницаемых пакетов согласно приведенному ранее описанию (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., **2008**, J Immunother., 31:742-751, и Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) или газопроницаемых флаконов G-Rex. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение осуществляют с использованием флаконов. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение осуществляют с использованием газопроницаемых флаконов G-Rex. Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение осуществляют во флаконах T-175; приблизительно 1×10^6 TIL суспендируют приблизительно в 150 мл среды и добавляют в каждый флакон T-175. TIL культивируют с облученными (50 Гр) аллогенными МКПК в качестве «фидерных» клеток в соотношении 1 : 100; клетки культивировали в 1 : 1 смеси сред CM и AIM-V (среда 50/50) с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и 30 нг/мл антитела к CD3. Флаконы T-175 инкубируют при 37°C в 5% CO_2. Согласно некоторым вариантам реализации половину среды заменяют на 5 день средой 50/50 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации на 7 день клетки из

2 флаконов T-175 объединяют в пакете объемом 3 л и добавляют 300 мл AIM-V с 5% AB сыворотки человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в 300 мл суспензии TIL. Количество клеток в каждом пакете может подсчитываться каждый день или каждые два дня, и может быть добавлена свежая среда для поддержания количества клеток на уровне от приблизительно 0,5 до приблизительно $2,0\times10^6$ клеток/мл.

[001467] В некоторых вариантах осуществления второе расширение (в том числе разложения называют РЭП) выполняются в 500 колб емкостью мл с 100 см ^{2} газопроницаемые кремния днища (G-Rex 100, Уилсон Вольф) (рис. 1), примерно 5×10^6 или 10×10^6 TIL культивируют с облученными аллогенными PBMC в соотношении от 1 до 100 в 400 мл среды 50/50, дополненной 3000 МЕ/мл ИЛ-2 и 30 нг/мл анти-CD3. Флаконы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2. Согласно некоторым вариантам реализации на 5 день 250 мл супернатанта могут быть извлечены и помещены в центрифужные флаконы и центрифугированы при 1500 об/мин (491 × g) в течение 10 минут. Клеточный осадок TIL может быть затем ресуспендирован с 150 мл свежей среды 50/50 с 3000 МЕ/ мл ИЛ-2 и возвращен в исходные флаконы G-Rex 100. Согласно вариантам реализации, когда TIL последовательно размножают во флаконах G-Rex 100, на 7 день TIL в каждом G-Rex 100 суспендируют в 300 мл среды, присутствующей в каждом флаконе, и суспензию клеток разделяют на 3 х 100 мл аликвоты, которые используют для посева в 3 флакона G-Rex 100. Затем в каждый флакон добавляют по 150 мл AIM-V с 5% AB сыворотки человека и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Флаконы G-Rex 100 инкубируют при 37°C в 5% CO_2 и через 4 дня добавляют по 150 мл AIM-V с 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в каждый флакон G-REX 100. Клетки собирают на 14 день культивирования.

[001468] Разнообразные антигенные рецепторы Т- и В-лимфоцитов продуцируются за счет соматической рекомбинации ограниченного, но значительного количества генных сегментов Указанные генные сегменты: V (вариабельный), D (разнообразие), J (соединительный) и C (константный) определяют специфичность связывания и последующее применение иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов (TCR). Согласно настоящему изобретению предложен способ получения TIL, которые демонстрируют и увеличивают разнообразие репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные при втором размножении, демонстрируют увеличение разнообразия репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанное увеличение разнообразия представляет собой увеличение разнообразия иммуноглобулинов и/или разнообразия Т-клеточных рецепторов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к тяжелой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие иммуноглобулинов относится к легкой цепи иммуноглобулинов. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к Т-клеточному рецептору. Согласно некоторым вариантам реализации указанное разнообразие относится к одному из Т-клеточных

рецепторов, выбранных из группы, состоящей из рецепторов альфа, бета, гамма и дельта. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа и/или бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) альфа. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии Т-клеточного рецептора (TCR) бета. Согласно некоторым вариантам реализации происходит повышение экспрессии TCRab (*т.е.* TCRα/β).

[001469] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение культуральная среда (*например,* иногда называемая CM2 или второй клеточной культуральной средой), содержит ИЛ-2, OKT-3, а также антигенпрезентирующие фидерные клетки (АПК), как более подробно описано ниже.

[001470] Согласно некоторым вариантам реализации второе размножение, например, этап D в соответствии с фиг. 109, осуществляют в биореакторе с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации закрытую систему используют для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации используют единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный единственный используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор с закрытой системой представляет собой единственный биореактор.

[001471] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в процессах размножения согласно описанию в настоящем документе, представляет собой бессывороточную среду или среду с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом применяют для предотвращения и/или уменьшения экспериментальной изменчивости, частично обусловленной изменчивостью содержащих сыворотку сред от партии к партии.

[001472] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими: CTS™ OpTmizer™ Базальная среда для увеличения Т-клеток, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), питательная среда RPMI и модифицированную Исковым среду Дульбекко.

[001473] Согласно некоторым вариантам реализации сывороточная добавка или

заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки CTS™ OpTmizer заменитель сыворотки для иммунных клеток CTS™, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одну или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[001474] Согласно некоторым вариантам реализации заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement применяют со стандартными ростовыми средами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, CST™ AIM-V SFM, среду для размножения Т-клеток без ксеногенных компонентов LymphoONE™, среду Игла, модифицированную по Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среду Глазго (G-MEM), ростовую среду RPMI и среду Дульбекко, модифицированную по Искову.

[001475] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки (% об.) в указанной бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[001476] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду

для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ.

[001477] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для

размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001478] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или 4 мМ до приблизительно 5 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[001479] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[001480] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным

составом, описанные в международной PCT-публикации WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для применения согласно настоящему изобретению. В указанной публикации описана бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток. Указанная бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток включает базальную клеточную культуральную среду с добавлением бессывороточной добавки, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной культуральной среды для эукариотических клеток содержит или получена путем комбинирования одного или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более следовых элементов, и одного или более антибиотиков. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин или заменитель альбумина и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанный базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), питательной среды RPMI и модифицированной Исковым среды Дульбекко.

[001481] Согласно некоторым вариантам реализации указанный концентрация глицина в среде с определенным составом находится в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L- гистидина составляет приблизительно 5-250 мг/л, концентрация L-изолейцина составляет приблизительно 5-300 мг/л, концентрация L-метионина составляет приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-фенилаланина составляет приблизительно 5-400 мг/л, концентрация L-пролина составляет приблизительно 1-1000 мг/л, концентрация L- гидроксипролина составляет приблизительно 1-45 мг/л, концентрация L-серина

составляет приблизительно 1-250 мг/л, концентрация L-треонина составляет приблизительно 10-500 мг/л, концентрация L-триптофана составляет приблизительно 2-110 мг/л, концентрация L-тирозина составляет приблизительно 3-175 мг/л, концентрация L-валина составляет приблизительно 5-500 мг/л, концентрация тиамина составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация восстановленного глутатиона составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация L-аскорбиновая кислота-2-фосфата составляет приблизительно 1-200 мг/л, концентрация насыщенного железом трансферрина составляет приблизительно 1-50 мг/л, концентрация инсулина составляет приблизительно 1-100 мг/л, концентрация селенита натрия составляет приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л, и концентрация альбумина (например, AlbuMAX® I) составляет приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[001482] Согласно некоторым вариантам реализации в среде с определенным составом присутствуют ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в IX среде» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в конечных концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации IX среды» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанная бессывороточная добавка содержит не содержащие следовых элементов ингредиенты типов и в концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации добавки» в таблице A ниже.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, не содержащих следовых элементов

Ингредиент	Предпочтительный вариант реализации добавки (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в IX среде (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант реализации в IX среде (мг/л) (Приблизительно)
Глицин	150	5-200	53
L-Гистидин	940	5-250	183
L-Изолейцин	3400	5-300	615
L-Метионин	90	5-200	44
L-Фенилаланин	1800	5-400	336
L-Пролин	4000	1-1000	600
L-Гидроксипролин	100	1-45	15
L-Серин	800	1-250	162
L-Треонин	2200	10-500	425
L-Триптофан	440	2-110	82

L-Тирозин	77	3-175	84
L-Валин	2400	5-500	454
Тиамин	33	1-20	9
восстановленный глутатион	10	1-20	1,5
Аскорбиновая кислота-2-PO_4 (Соль Mg)	330	1-200	50
Трансферрин (насыщенный железом)	55	1-50	8
Инсулин	100	1-100	10
Селенит Натрия	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83 000	5000-50 000	12 500

[001483] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации в среду с определенным составом добавляют до приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия. В указанную среду с определенным составом может быть дополнительно добавлен L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ), 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[001484] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в источнике: Smith, et al., “Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,” Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31), подходят для применения согласно настоящему изобретению. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды, и добавляли 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[001485] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры, необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известный как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

1. Фидерные клетки и антигенпрезентирующие клетки

[001486] Согласно варианту реализации для процедур второго размножения, описанные в настоящем документе (например, включающих размножение, например, описанных для этапа D на фиг. 109, а также процедур, называемых REP) требуется избыток фидерных клеток при REP размножении TIL и/или в ходе второго размножения. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. МКПК получают с применением стандартных способов, таких как разделение в градиенте плотности фиколл-пак.

[001487] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах REP согласно описанию в примерах, где представлен пример протокола оценки репликативной некомпетентности облученных аллогенных МКПК.

[001488] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедуре размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток на 14 день меньше количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (*т.е.* день начала второго размножения). См., например, пример 14.

[001489] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 и 14 день не увеличилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (*т.е.* день начала второго размножения). Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 30 нг/мл антитела OKT3 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2. См., например, пример 13.

[001490] Согласно некоторым вариантам реализации МКПК считают репликативно некомпетентными и приемлемыми для применения в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе, если общее количество жизнеспособных клеток, культивированных в присутствии OKT3 и ИЛ-2, на 7 день и 14 день не увеличилось относительно исходного количества жизнеспособных клеток, помещенных в культуру на 0 день REP и/или 0 день второго размножения (*т.е.* день начала второго размножения). Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 5-60 нг/мл антитела OKT3 и 1000-6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 10-50 нг/мл антитела OKT3 и 2000-5000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 20-40 нг/мл антитела OKT3 и 2000-4000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации указанные МКПК культивируют в присутствии 25-35 нг/мл антитела OKT3 и 2500-3500 МЕ/мл ИЛ-2.

[001491] Согласно некоторым вариантам реализации указанные

антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой МКПК. Согласно некоторым вариантам реализации указанные антигенпрезентирующие фидерные клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие фидерные клетки. Согласно варианту реализации отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет приблизительно от 1 до 25, приблизительно от 1 до 50, приблизительно от 1 до 100, приблизительно от 1 до 125, приблизительно от 1 до 150, приблизительно от 1 до 175, приблизительно от 1 до 200, приблизительно от 1 до 225, приблизительно от 1 до 250, приблизительно от 1 до 275, приблизительно от 1 до 300, приблизительно от 1 до 325, приблизительно от 1 до 350, приблизительно от 1 до 375, приблизительно от 1 до 400 или приблизительно от 1 до 500. Согласно варианту реализации отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 50 и до 1 к 300. Согласно варианту реализации отношение TIL к антигенпрезентирующим фидерным клеткам при втором размножении составляет от 1 к 100 и до 1 к 200.

[001492] Согласно варианту реализации для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, требуется отношение, составляющее приблизительно $2,5\times10^9$ фидерных клеток на приблизительно 100×10^6 TIL. Согласно другому варианту реализации для процедур второго размножения согласно описанию в настоящем документе требуется отношение, составляющее приблизительно $2,5\times10^9$ фидерных клеток на приблизительно 50×10^6 TIL. Согласно еще одному варианту реализации для процедур второго размножения согласно описанию в настоящем документе требуется приблизительно $2,5\times10^9$ фидерных клеток на приблизительно 25×10^6 TIL.

[001493] Согласно варианту реализации для процедур второго размножения, описанных в настоящем документе, требуется избыток фидерных клеток в ходе второго размножения. Согласно многим вариантам реализации указанные фидерные клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), полученные из стандартных единиц цельной крови от здоровых доноров крови. Указанные МКПК получают с применением стандартных способов, таких как разделение в градиенте плотности фиколл-пак. Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие (иАПК) клетки используют вместо МКПК.

[001494] В общем случае, аллогенные МКПК инактивируют, посредством облучения или термической обработки, и используют в процедурах размножения TIL, описанных в настоящем документе.

[001495] Согласно варианту реализации искусственные антигенпрезентирующие клетки используют при втором размножении в качестве замены или в комбинации с МКПК.

2. Цитокины

[001496] В описанных здесь способах размножения обычно используют культуральные среды с высокими дозами цитокина, в частности, ИЛ-2, как известно в данной области техники.

[001497] Как вариант, возможно также применение комбинаций цитокинов для быстрого размножения и/или второго размножения TIL, при этом комбинации содержат два или более цитокина из ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21,согласно общему описанию в международных публикациях WO 2015/189356 и WO 2015/189357, явным образом и полностью включенных в настоящий документ посредством ссылки. Соответственно, возможные комбинации включают ИЛ-2 и ИЛ-15, ИЛ-2 и ИЛ-21, ИЛ-15 и ИЛ-21, и ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, причем последняя комбинация, в частности, находит применение во многих вариантах реализации Использование комбинаций цитокинов особенно благоприятствует образованию лимфоцитов и, в частности, Т-клеток согласно описанию в настоящем документе

3. Антитела против CD3

[001498] Согласно некоторым вариантам реализации культуральная среда, используемая в способах размножения согласно настоящему документу (в том числе размножения, называемого REP, см. например, фиг. 109), также включает антитело против CD3. Антитело против CD3 в комбинации с ИЛ-2 индуцирует активацию Т-клеток и деление клеток в популяции TIL. Указанный эффект можно наблюдать с полноразмерными антителами, а также с фрагментами Fab и F(ab')2, причем первые в общем случае являются предпочтительными;; см., например, источник: Tsoukas et al., J. Immunol. **1985,** 135, 1719, полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки.

[001499] Как будет понятно специалистам в данной области техники, существует ряд подходящих антител против CD3 человека, которые находят применение согласно настоящему изобретению, в том числе поликлональные и моноклональные антитела против CD3 человека от различных млекопитающих, включая, но не ограничиваясь, антитела мыши, человека, приматов, крыс и антитела собачьих. Согласно конкретным вариантам реализации применяют антитело OKT3 против CD3 (коммерчески доступное от Ortho-McNeil, Раритан, Нью-Джерси, или Miltenyi Biotech, Оберн, Калифорния).

ЭТАП E: Сбор TIL

[001500] После этапа второго размножения клетки могут быть собраны Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL собирают после одного, двух, трех, четырех или более этапов размножения, например, как показано на фиг. 109. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL собирают после двух этапов размножения, например, как показано на фиг. 109.

[001501] TIL могут быть собраны любым подходящим стерильным способом, включая, например, центрифугирование. Способы сбора TIL хорошо известны в данной области техники, и в предложенном процессе можно использовать любые такие известные методы. Согласно некоторым вариантам реализации TILS собирают с использованием автоматизированной системы

[001502] Коллекторы клеток и/или системы обработки клеток коммерчески доступны из различных источников, включая, например, Fresenius Kabi, Tomtec Life

Science, Perkin Elmer и Inotech Biosystems International, Inc. В предложенных способах можно использовать любой коллектор клеток. Согласно некоторым вариантам реализации указанный коллектор клеток и/или указанные системы обработки клеток представлены мембранным коллектором клеток. Согласно некоторым вариантам реализации сбор клеток осуществляют с помощью системы обработки клеток, такой как система LOVO (изготовитель - Fresenius Kabi). Термин «система обработки клеток LOVO» также относится к любому инструменту или устройству, изготавливаемому любым поставщиком, которое может перекачивать раствор, содержащий клетки, через мембрану или фильтр, такие как вращающаяся мембрана или вращающийся фильтр, в среде стерильной и/или закрытой системы, обеспечивая непрерывный поток и обработку клеток с удалением супернатанта или клеточной культуральной среды без оседания. Согласно некоторым вариантам реализации указанные коллектор клеток и/или система обработки клеток могут выполнять разделение клеток, промывание, замену жидкостей, концентрирование и/или другие этапы обработки клеток в закрытой стерильной системе.

[001503] Согласно некоторым вариантам реализации указанный сбор, например, этап E в соответствии с фиг. 109, осуществляют из биореактора с закрытой системой. Согласно некоторым вариантам реализации для размножения TIL согласно описанию в настоящем документе используют закрытую систему. Согласно некоторым вариантам реализации используют единственный биореактор. Согласно некоторым вариантам реализации указанный единственный используемый биореактор представляет собой, например, G-REX-10 или G-REX-100. Согласно некоторым вариантам реализации указанный биореактор с закрытой системой представляет собой единственный биореактор.

ЭТАП F: Получение итогового состава/ Перенос в пакет для инфузии

[001504] После завершения этапов A-E, как указано в примере порядка на фиг. 109 и подробно описано здесь и выше, клетки переносят в контейнер для введения пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации после получения терапевтически достаточного числа TIL с применением способов размножения, описанных выше, их переносят в контейнер, чтобы использовать для введения пациенту.

[001505] Согласно варианту реализации TIL, размноженные с применением АПК согласно настоящему описанию вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. Согласно варианту реализации указанная фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с применением МКПК согласно настоящему описанию, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно продолжается приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение

1. Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

[001506] Согласно варианту реализации TIL, размноженные с применением

способов согласно настоящему описанию, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. Согласно варианту реализации указанная фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с применением МКПК согласно настоящему описанию, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно продолжается приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение

[001507] Может вводиться любая подходящая доза TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$ TIL, в среднем приблизительно $7,8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. Согласно варианту реализации вводят приблизительно $1,2\times10^{10}$ до приблизительно $4,3\times10^{10}$ TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $7,8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $1,2\times10^{10}$ до приблизительно $4,3\times10^{10}$ TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[001508] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению составляет приблизительно 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10},

2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. Согласно варианту реализации число TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от 1×10^{6} до 5×10^{6}, от 5×10^{6} до 1×10^{7}, от 1×10^{7} до 5×10^{7}, от 5×10^{7} до 1×10^{8}, от 1×10^{8} до 5×10^{8}, от 5×10^{8} до 1×10^{9}, от 1×10^{9} до 5×10^{9}, от 5×10^{9} до 1×10^{10}, от 1×10^{10} до 5×10^{10}, от 5×10^{10} до 1×10^{11}, от 5×10^{11} до 1×10^{12}, от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

[001509] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению меньше чем, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001510] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению превышает 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001511] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 50%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 40%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 29%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 28%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 27%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 26%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 24%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 23%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 22%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 21%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,3% до

приблизительно 19%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 18%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 17%, от приблизительно 0,6% до приблизительно 16%, от приблизительно 0,7% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,8% до приблизительно 14%, от приблизительно 0,9% до приблизительно 12% или приблизительно 1% до приблизительно 10% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001512] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 4,5%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 3,5%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 2%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 1,5%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 1%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,9% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001513] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL, входящих в состав фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, составляет точно или менее чем 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

[001514] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению больше 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[001515] TIL, входящие в состав фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, эффективны в широком диапазоне дозировок. Точная дозировка зависит от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, подлежащего лечению, а также предпочтений и опыта лечащего врача. Если это целесообразно, также могут использоваться клинически установленные дозы TIL. Количества фармацевтических композиций, вводимых с использованием описанных в настоящем документе способов,

такие как дозировки TIL, зависят от человека или млекопитающего, лечение которого проводят, тяжести расстройства или состояния, скорости введения, распределения активных фармацевтических ингредиентов и соображений лечащего врача.

[001516] Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть введены в виде однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, *например*, внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть введены в нескольких дозах. Дозирование может происходить один, два, три, четыре, пять, шесть или более шести раз в год. Дозирование может происходить один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или каждые два дня. Введение TIL может продолжаться, пока это будет необходимо.

[001517] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL составляет приблизительно 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9, 9×10^9, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от 1×10^6 до 5×10^6, от 5×10^6 до 1×10^7, от 1×10^7 до 5×10^7, от 5×10^7 до 1×10^8, от 1×10^8 до 5×10^8, от 5×10^8 до 1×10^9, от 1×10^9 до 5×10^9, от 5×10^9 до 1×10^{10}, от 1×10^{10} до 5×10^{10}, от 5×10^{10} до 1×10^{11}, от 5×10^{11} до 1×10^{12}, от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

[001518] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 4,3 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,2 мг/кг, от приблизительно 0,35 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг до приблизительно 2,15 мг/кг, от приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, от приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 1,3 мг/кг, от приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 1,15 мг/кг, от приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, от приблизительно 0,55 мг/кг до приблизительно 0,85 мг/кг, от приблизительно 0,65 мг/кг до приблизительно 0,8 мг/кг, от приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 0,75 мг/кг, от приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 2,15 мг/кг, от приблизительно 0,85 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1,85 мг/кг, от приблизительно 1,15 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, от приблизительно 1,3 мг/кг мг до приблизительно 1,6 мг/кг, от приблизительно 1,35 мг/кг до приблизительно 1,5 мг/кг, от приблизительно 2,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, от приблизительно 2,3 мг/кг до приблизительно 3,4 мг/кг, от приблизительно 2,4 мг/кг до приблизительно 3,3 мг/кг, от приблизительно 2,6 мг/кг до приблизительно 3,15 мг/кг, от приблизительно 2,7 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 2,8 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг или от

приблизительно 2,85 мг/кг до приблизительно 2,95 мг/кг.

[001519] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 45 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 40 мг, от приблизительно 15 мг до приблизительно 35 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 30 мг, от приблизительно 23 мг до приблизительно 28 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 60 мг до приблизительно 140 мг, от приблизительно 70 мг до приблизительно 130 мг, от приблизительно 80 мг до приблизительно 120 мг, от приблизительно 90 мг до приблизительно 110 мг или приблизительно 95 мг до приблизительно 105 мг, от приблизительно 98 мг до приблизительно 102 мг, от приблизительно 150 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 160 мг до приблизительно 240 мг, от приблизительно 170 мг до приблизительно 230 мг, от приблизительно 180 мг до приблизительно 220 мг, от приблизительно 190 мг до приблизительно 210 мг, от приблизительно 195 мг до приблизительно 205 мг или от приблизительно 198 до приблизительно 207 мг.

[001520] Эффективное число TIL может вводиться либо в одной, либо в нескольких дозах любым из принятых способов введения агентов с аналогичными функциями, в том числе интраназальным и чрескожным путями, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, путем трансплантации или путем ингаляции.

Фармацевтические композиции, дозировки и режимы дозирования

[001521] Согласно варианту реализации TIL, размноженные с применением способов согласно настоящему описанию, вводят пациенту в виде фармацевтической композиции. Согласно варианту реализации указанная фармацевтическая композиция представляет собой суспензию TIL в стерильном буфере. TIL, размноженные с применением МКПК согласно настоящему описанию, можно вводить любым подходящим путем, известным в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации указанные Т-клетки вводят в виде однократной внутриартериальной или внутривенной инфузии, которая предпочтительно продолжается приблизительно от 30 до 60 минут. Другие подходящие пути включают внутрибрюшинное, интратекальное и внутрилимфатическое введение.

[001522] Может вводиться любая подходящая доза TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$ TIL, в среднем приблизительно $7,8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. Согласно варианту реализации вводят от приблизительно $1,2\times10^{10}$ до приблизительно $4,3\times10^{10}$ TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от

приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации вводят от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $2{,}3\times10^{10}$ до приблизительно $13{,}7\times10^{10}$. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет приблизительно $7{,}8\times10^{10}$ TIL, в частности, если рак представляет собой меланому. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно $1{,}2\times10^{10}$ до приблизительно $4{,}3\times10^{10}$ TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 3×10^{10} до приблизительно 12×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 4×10^{10} до приблизительно 10×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 5×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 6×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL. Согласно некоторым вариантам реализации терапевтически эффективная дозировка составляет от приблизительно 7×10^{10} до приблизительно 8×10^{10} TIL.

[001523] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению составляет приблизительно 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. Согласно варианту реализации число TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от 1×10^{6} до 5×10^{6}, 5×10^{6} до 1×10^{7}, 1×10^{7} до 5×10^{7}, 5×10^{7} до 1×10^{8}, 1×10^{8} до 5×10^{8}, 5×10^{8} до 1×10^{9}, 1×10^{9} до 5×10^{9}, 5×10^{9} до 1×10^{10}, 1×10^{10} до 5×10^{10}, 5×10^{10} до 1×10^{11}, 5×10^{11} до 1×10^{12}, 1×10^{12} до 5×10^{12}, и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

[001524] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению меньше чем, например, 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%,

0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001525] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению превышает 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19,75%, 19,50%, 19,25% 19%, 18,75%, 18,50%, 18,25% 18%, 17,75%, 17,50%, 17,25% 17%, 16,75%, 16,50%, 16,25% 16%, 15,75%, 15,50%, 15,25% 15%, 14,75%, 14,50%, 14,25% 14%, 13,75%, 13,50%, 13,25% 13%, 12,75%, 12,50%, 12,25% 12%, 11,75%, 11,50%, 11,25% 11%, 10,75%, 10,50%, 10,25% 10%, 9,75%, 9,50%, 9,25% 9%, 8,75%, 8,50%, 8,25% 8%, 7,75%, 7,50%, 7,25% 7%, 6,75%, 6,50%, 6,25% 6%, 5,75%, 5,50%, 5,25% 5%, 4,75%, 4,50%, 4,25%, 4%, 3,75%, 3,50%, 3,25%, 3%, 2,75%, 2,50%, 2,25%, 2%, 1,75%, 1,50%, 125%, 1%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,09%, 0,08%, 0,07%, 0,06%, 0,05%, 0,04%, 0,03%, 0,02%, 0,01%, 0,009%, 0,008%, 0,007%, 0,006%, 0,005%, 0,004%, 0,003%, 0,002%, 0,001%, 0,0009%, 0,0008%, 0,0007%, 0,0006%, 0,0005%, 0,0004%, 0,0003%, 0,0002% или 0,0001% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001526] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в составе фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,0001% до приблизительно 50%, от приблизительно 0,001% до приблизительно 40%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 30%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 29%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 28%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 27%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 26%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 25%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 24%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 23%, от приблизительно 0,09% до приблизительно 22%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 21%, от приблизительно 0,2% до приблизительно 20%, от приблизительно 0,3% до приблизительно 19%, от приблизительно 0,4% до приблизительно 18%, от приблизительно 0,5% до приблизительно 17%, от приблизительно 0,6% до приблизительно 16%, от приблизительно 0,7% до приблизительно 15%, от приблизительно 0,8% до приблизительно 14%, от приблизительно 0,9% до приблизительно 12% или приблизительно 1% до приблизительно 10% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001527] Согласно некоторым вариантам реализации концентрация TIL в фармацевтических композициях согласно настоящему изобретению находится в диапазоне от приблизительно 0,001% до приблизительно 10%, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5%, от приблизительно 0,02% до приблизительно 4,5%, от приблизительно 0,03% до приблизительно 4%, от приблизительно 0,04% до приблизительно 3,5%, от приблизительно 0,05% до приблизительно 3%, от приблизительно 0,06% до приблизительно 2,5%, от приблизительно 0,07% до приблизительно 2%, от приблизительно 0,08% до приблизительно 1,5%, от

приблизительно 0,09% до приблизительно 1%, от приблизительно 0,1% до приблизительно 0,9% фармацевтической композиции по массе, массе/объему или по объему.

[001528] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL, входящих в состав фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, составляет точно или менее чем 10 г, 9,5 г, 9,0 г, 8,5 г, 8,0 г, 7,5 г, 7,0 г, 6,5 г, 6,0 г, 5,5 г, 5,0 г, 4,5 г, 4,0 г, 3,5 г, 3,0 г, 2,5 г, 2,0 г, 1,5 г, 1,0 г, 0,95 г, 0,9 г, 0,85 г, 0,8 г, 0,75 г, 0,7 г, 0,65 г, 0,6 г, 0,55 г, 0,5 г, 0,45 г, 0,4 г, 0,35 г, 0,3 г, 0,25 г, 0,2 г, 0,15 г, 0,1 г, 0,09 г, 0,08 г, 0,07 г, 0,06 г, 0,05 г, 0,04 г, 0,03 г, 0,02 г, 0,01 г, 0,009 г, 0,008 г, 0,007 г, 0,006 г, 0,005 г, 0,004 г, 0,003 г, 0,002 г, 0,001 г, 0,0009 г, 0,0008 г, 0,0007 г, 0,0006 г, 0,0005 г, 0,0004 г, 0,0003 г, 0,0002 г или 0,0001 г.

[001529] Согласно некоторым вариантам реализации число TIL, входящих в состав фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, составляет более 0,0001 г, 0,0002 г, 0,0003 г, 0,0004 г, 0,0005 г, 0,0006 г, 0,0007 г, 0,0008 г, 0,0009 г, 0,001 г, 0,0015 г, 0,002 г, 0,0025 г, 0,003 г, 0,0035 г, 0,004 г, 0,0045 г, 0,005 г, 0,0055 г, 0,006 г, 0,0065 г, 0,007 г, 0,0075 г, 0,008 г, 0,0085 г, 0,009 г, 0,0095 г, 0,01 г, 0,015 г, 0,02 г, 0,025 г, 0,03 г, 0,035 г, 0,04 г, 0,045 г, 0,05 г, 0,055 г, 0,06 г, 0,065 г, 0,07 г, 0,075 г, 0,08 г, 0,085 г, 0,09 г, 0,095 г, 0,1 г, 0,15 г, 0,2 г, 0,25 г, 0,3 г, 0,35 г, 0,4 г, 0,45 г, 0,5 г, 0,55 г, 0,6 г, 0,65 г, 0,7 г, 0,75 г, 0,8 г, 0,85 г, 0,9 г, 0,95 г, 1 г, 1,5 г, 2 г, 2,5, 3 г, 3,5, 4 г, 4,5 г, 5 г, 5,5 г, 6 г, 6,5 г, 7 г, 7,5 г, 8 г, 8,5 г, 9 г, 9,5 г или 10 г.

[001530] TIL, входящие в состав фармацевтических композиций согласно настоящему изобретению, эффективны в широком диапазоне дозировок. Точная дозировка зависит от пути введения, формы, в которой вводят соединение, пола и возраста субъекта, подлежащего лечению, массы тела субъекта, подлежащего лечению, а также предпочтений и опыта лечащего врача. Если это целесообразно, также могут использоваться клинически установленные дозы TIL. Количества фармацевтических композиций, вводимых с использованием описанных в настоящем документе способов, такие как дозировки TIL, зависят от человека или млекопитающего, лечение которого проводят, тяжести расстройства или состояния, скорости введения, распределения активных фармацевтических ингредиентов и соображений лечащего врача.

[001531] Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть введены в виде однократной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, *например*, внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть введены в нескольких дозах. Дозирование может происходить один, два, три, четыре, пять, шесть или более шести раз в год. Дозирование может происходить один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или каждые два дня. Введение TIL может продолжаться, пока это будет необходимо.

[001532] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL составляет приблизительно 1×10^6, 2×10^6, 3×10^6, 4×10^6, 5×10^6, 6×10^6, 7×10^6, 8×10^6, 9×10^6, 1×10^7, 2×10^7, 3×10^7, 4×10^7, 5×10^7, 6×10^7, 7×10^7, 8×10^7, 9×10^7, 1×10^8, 2×10^8, 3×10^8, 4×10^8, 5×10^8, 6×10^8, 7×10^8, 8×10^8, 9×10^8, 1×10^9, 2×10^9, 3×10^9, 4×10^9, 5×10^9, 6×10^9, 7×10^9, 8×10^9,

9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} и 9×10^{13}. Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от 1×10^{6} до 5×10^{6}, от 5×10^{6} до 1×10^{7}, от 1×10^{7} до 5×10^{7}, от 5×10^{7} до 1×10^{8}, от 1×10^{8} до 5×10^{8}, от 5×10^{8} до 1×10^{9}, от 1×10^{9} до 5×10^{9}, от 5×10^{9} до 1×10^{10}, от 1×10^{10} до 5×10^{10}, от 5×10^{10} до 1×10^{11}, от 5×10^{11} до 1×10^{12}, от 1×10^{12} до 5×10^{12} и от 5×10^{12} до 1×10^{13}.

[001533] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 4,3 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 3,2 мг/кг, приблизительно 0,35 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 2,85 мг/кг, приблизительно 0,3 мг до приблизительно 2,15 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, приблизительно 0,15 мг/кг до приблизительно 1,3 мг/кг, приблизительно 0,3 мг/кг до приблизительно 1,15 мг/кг, приблизительно 0,45 мг/кг до приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 0,55 мг/кг до приблизительно 0,85 мг/кг, приблизительно 0,65 мг/кг до приблизительно 0,8 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 0,75 мг/кг, приблизительно 0,7 мг/кг до приблизительно 2,15 мг/кг, приблизительно 0,85 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1,85 мг/кг, приблизительно 1,15 мг/кг до приблизительно 1,7 мг/кг, приблизительно 1,3 мг/кг мг до приблизительно 1,6 мг/кг, приблизительно 1,35 мг/кг до приблизительно 1,5 мг/кг, приблизительно 2,15 мг/кг до приблизительно 3,6 мг/кг, приблизительно 2,3 мг/кг до приблизительно 3,4 мг/кг, приблизительно 2,4 мг/кг до приблизительно 3,3 мг/кг, приблизительно 2,6 мг/кг до приблизительно 3,15 мг/кг, приблизительно 2,7 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 2,8 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг или от приблизительно 2,85 мг/кг до приблизительно 2,95 мг/кг.

[001534] Согласно некоторым вариантам реализации эффективная дозировка TIL находится в диапазоне от приблизительно 1 мг до приблизительно 500 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 300 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 250 мг, от приблизительно 25 мг до приблизительно 200 мг, от приблизительно 1 мг до приблизительно 50 мг, от приблизительно 5 мг до приблизительно 45 мг, от приблизительно 10 мг до приблизительно 40 мг, от приблизительно 15 мг до приблизительно 35 мг, от приблизительно 20 мг до приблизительно 30 мг, от приблизительно 23 мг до приблизительно 28 мг, от приблизительно 50 мг до приблизительно 150 мг, от приблизительно 60 мг до приблизительно 140 мг, от приблизительно 70 мг до приблизительно 130 мг, от приблизительно 80 мг до приблизительно 120 мг, от приблизительно 90 мг до приблизительно 110 мг или от приблизительно 95 мг до приблизительно 105 мг, от приблизительно 98 мг до приблизительно 102 мг, от приблизительно 150 мг до

приблизительно 250 мг, от приблизительно 160 мг до приблизительно 240 мг, от приблизительно 170 мг до приблизительно 230 мг, от приблизительно 180 мг до приблизительно 220 мг, от приблизительно 190 мг до приблизительно 210 мг, от приблизительно 195 мг до приблизительно 205 мг или от приблизительно 198 до приблизительно 207 мг.

[001535] Эффективное число TIL может вводиться либо в одной, либо в нескольких дозах любым из принятых способов введения агентов с аналогичными функциями, в том числе интраназальным и чрескожным путями, путем внутриартериальной инъекции, внутривенно, внутрибрюшинно, парентерально, внутримышечно, подкожно, местно, путем трансплантации или путем ингаляции.

[001536] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен пакет для инфузии, содержащий терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях.

[001537] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) содержащая терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, и фармацевтически приемлемый носитель.

[001538] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен пакет для инфузии, содержащий композицию TIL, описанную в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях,.

[001539] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен криоконсервированный препарат с терапевтической популяцией TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях.

[001540] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL, описанную в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, и среду для криоконсервации.

[001541] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что среда для криоконсервации содержит ДМСО.

[001542] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что среда для криоконсервации содержит 7-10% ДМСО.

[001543] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены композиции TIL, содержащие TIL в бессывороточной среде или среде с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную

клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. Согласно некоторым вариантам реализации указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом применяют для предотвращения и/или уменьшения экспериментальной изменчивости, частично обусловленной изменчивостью содержащих сыворотку сред от партии к партии.

[001544] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки. В некоторых вариантах реализации базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими: CTS™ OpTmizer™ Базальная среда для увеличения Т-клеток, CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, CTS™ AIM-V Medium, CTS™ AIM-V SFM, LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среду Игла, модифицированную Дульбекко (DMEM), минимальную питательную среду (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальную питательную среда Глазго (G-MEM), питательную среда RPMI и модифицированную Исковым среду Дульбекко.

[001545] Согласно некоторым вариантам реализации сывороточная добавка или заменитель сыворотки включает, не ограничиваясь перечисленным, одно или более из сывороточной добавки CTS™ OpTmizer заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, один или более альбуминов или заменителей альбумина, одну или более аминокислот, один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов, один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов, один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

[001546] Согласно некоторым вариантам реализации заменитель сыворотки CTS™OpTmizer™ T-cell Immune Cell Serum Replacement применяют со стандартными ростовыми средами, в том числе, но не ограничиваясь перечисленными, базальной средой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, бессывороточной средой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, средой CTS™ AIM-V, CST™ AIM-V SFM, средой для размножения Т-клеток без ксеногенных компонентов LymphoONE™, средой Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной средой (MEM), базальной средой Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной средой

(αMEM), минимальной питательной средой Глазго (G-MEM), ростовой средой RPMI и модифицированной Исковым средой Дульбекко.

[001547] Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки (% об.) в указанной бессывороточной среде или среде с определенным составом составляет от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 3% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 5% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом. Согласно некоторым вариантам реализации общая концентрация заменителя сыворотки составляет приблизительно 10% от общего объема бессывороточной среды или среды с определенным составом.

[001548] Согласно некоторым вариантам реализации указанная бессывороточная среда или среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ.

[001549] Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ (ThermoFisher Scientific). Любой состав CTS™ OpTmizer™ подходит для применения согласно настоящему изобретению. Бессывороточная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ представляет собой комбинацию 1 л базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ и 26 мл добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, которые смешивают перед применением. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) наряду с 2-меркаптоэтанолом в концентрации 55 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют

приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific), 55 мМ 2-меркаптоэтанола и 2 мМ L-глутамина, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и 55 мМ 2-меркаптоэтанола, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит от приблизительно 1000 МЕ/мл до приблизительно 8000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Согласно некоторым вариантам реализации в бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™ добавляют приблизительно 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ (SR) (ThermoFisher Scientific) и приблизительно 2 мМ глутамин, и дополнительно среда содержит приблизительно 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001550] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до

приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ или 4 мМ до приблизительно 5 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

[001551] Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную бессывороточную среду или среду с определенным составом добавляют 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

[001552] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в международной PCT-публикации WO/1998/030679, которая включена в настоящий документ посредством ссылки, подходят для применения согласно настоящему изобретению. В указанной публикации описана бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток. Указанная бессывороточная культуральная среда для эукариотических клеток включает базальную клеточную культуральную среду с добавлением бессывороточной добавки, способной поддерживать рост клеток в бессывороточной культуре. Добавка для бессывороточной культуральной среды для эукариотических клеток содержит или получена путем комбинирования одного или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одного или более альбуминов или заменителей альбумина, одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, одного или более следовых элементов, и одного или более антибиотиков. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или бета-меркаптоэтанол. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин или заменитель альбумина и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из одной или более аминокислот, одного или более витаминов, одного или более трансферринов или заменителей трансферринов, одного или более антиоксидантов, одного или более инсулинов или заменителей инсулинов, одного или более предшественников коллагена, и одного или более следовых элементов. Согласно некоторым вариантам реализации указанная среда с определенным составом содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-

пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, $Cr^{3"}$, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}. Согласно некоторым вариантам реализации указанная базальная клеточная среда выбрана из группы, состоящей из среды Игла, модифицированной по Дульбекко (DMEM), минимальной питательной среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательной среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), ростовой среды RPMI и модифицированной Исковым среды Дульбекко.

[001553] Согласно некоторым вариантам реализации указанный концентрация глицина в среде с определенным составом находится в диапазоне от приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-гистидина составляет приблизительно 5-250 мг/л, концентрация L-изолейцина составляет приблизительно 5-300 мг/л, концентрация L-метионина составляет приблизительно 5-200 мг/л, концентрация L-фенилаланина составляет приблизительно 5-400 мг/л, концентрация L-пролина составляет приблизительно 1-1000 мг/л, концентрация L- гидроксипролина составляет приблизительно 1-45 мг/л, концентрация L-серина составляет приблизительно 1-250 мг/л, концентрация L-треонина составляет приблизительно 10-500 мг/л, концентрация L-триптофана составляет приблизительно 2-110 мг/л, концентрация L-тирозина составляет приблизительно 3-175 мг/л, концентрация L-валина составляет приблизительно 5-500 мг/л, концентрация тиамина составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация восстановленного глутатиона составляет приблизительно 1-20 мг/л, концентрация L-аскорбиновая кислота-2-фосфата составляет приблизительно 1-200 мг/л, концентрация насыщенного железом трансферрина составляет приблизительно 1-50 мг/л, концентрация инсулина составляет приблизительно 1-100 мг/л, концентрация селенита натрия составляет приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л, и концентрация альбумина (например, AlbuMAX® I) составляет приблизительно 5000-50 000 мг/л.

[001554] Согласно некоторым вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в IX среде» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации ингредиенты, не содержащие следовых элементов, в среде с определенным составом присутствуют в конечных концентрациях, указанных в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации IX среды» в таблице A ниже. Согласно другим вариантам реализации указанная среда с определенным составом представляет собой базальную клеточную среду, содержащую бессывороточную добавку. Согласно некоторым из указанных вариантов реализации указанная бессывороточная добавка содержит не содержащие следовых элементов ингредиенты, типы и концентрации которых указаны в столбце, обозначенном как «Предпочтительный вариант реализации добавки» в таблице A ниже.

Таблица A: Концентрации ингредиентов, не содержащих следовых элементов

Ингредиент	Предпочтительный вариант реализации добавки (мг/л) (Приблизительно)	Диапазон концентраций в IX среде (мг/л) (Приблизительно)	Предпочтительный вариант реализации в IX среде (мг/л) (Приблизительно)
Глицин	150	5-200	53
L-Гистидин	940	5-250	183
L-Изолейцин	3400	5-300	615
L-Метионин	90	5-200	44
L-Фенилаланин	1800	5-400	336
L-Пролин	4000	1-1000	600
L-Гидроксипролин	100	1-45	15
L-Серин	800	1-250	162
L-Треонин	2200	10-500	425
L-Триптофан	440	2-110	82
L-Тирозин	77	3-175	84
L-Валин	2400	5-500	454
Тиамин	33	1-20	9
восстановленный глутатион	10	1-20	1,5
Аскорбиновая кислота-2-PO_4 (Соль Mg)	330	1-200	50
Трансферрин (насыщенный железом)	55	1-50	8
Инсулин	100	1-100	10
Селенит натрия	0,07	0,000001-0,0001	0,00001
AlbuMAX®I	83 000	5000-50 000	12 500

[001555] Согласно некоторым вариантам реализации осмолярность среды с определенным составом составляет от приблизительно 260 до 350 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации указанный осмолярность составляет от приблизительно 280 до 310 мОсмоль. Согласно некоторым вариантам реализации в указанную среду с определенным составом добавляют до приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия. В указанную среду с определенным составом может быть дополнительно добавлен L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ),

один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ), 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

[001556] Согласно некоторым вариантам реализации среды с определенным составом, описанные в источнике: Smith, et al., «Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement,» Clin Transl Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) подходят для применения согласно настоящему изобретению. Вкратце, RPMI или CTS™ OpTmizer™ использовали в качестве базальной клеточной среды, и добавляли 0, 2%, 5% или 10% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

[001557] Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере представляет собой нефильтрованную среду. Применение нефильтрованной клеточной среды может упрощать процедуры необходимые для размножения количества клеток. Согласно варианту реализации клеточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известный как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

[001558] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен криоконсервированный препарат с композицией TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях.

Способы лечения пациентов

[001559] Способы лечения начинаются с начального сбора TIL и культивирования TIL. Такие способы сбора и культивирования были описаны в данной области техники, например, в источнике: Jin et al., J. Immunotherapy, **2012**, 35(3):283-292, включенном в настоящий документ полностью посредством ссылки. Варианты реализации способов лечения описаны в различных разделах ниже, в том числе в разделе примеров.

[001560] Размноженные TIL, полученные в соответствии со способами, описанными в настоящем документе, в том числе, например, согласно описанию этапов A-F выше или в соответствии с этапами A-F выше (также представленных, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) находят применением, в частности, в лечении пациентов с раком (например, согласно описанию в источнике: Goff, et al., J. Clinical Oncology, **2016**, 34(20):2389-239, а также в дополнительных материалах, которые полностью включены посредством ссылки в настоящий документ. Согласно некоторым вариантам реализации TIL культивировали из резецированных метастазов метастатической меланомы согласно приведенному ранее описанию (см. источник: Dudley, et al., J Immunother., **2003**, 26:332-342; полностью включенный посредством ссылки в настоящий документ). Свежая опухоль может быть рассечена в стерильных условиях. Репрезентативный образец может быть отобран для формального патологического анализа. Могут быть использованы одиночные фрагменты размером от 2 $мм^3$ до 3 $мм^3$. Согласно некоторым вариантам реализации получают 5, 10, 15, 20, 25 или 30 образцов для каждого пациента. Согласно некоторым вариантам реализации получают 20,

25 или 30 образцов для каждого пациента. Согласно некоторым вариантам реализации получают 20, 22, 24, 26 или 28 образцов для каждого пациента. Согласно некоторым вариантам реализации получают 24 образца для каждого пациента. Образцы могут быть помещены в отдельные лунки 24-луночного планшета, поддерживаться в ростовой среде с высокими дозами ИЛ-2 (6000 МЕ/мл), и может проводиться мониторинг разрушения опухоли и/или пролиферации TIL. Любая опухоль с жизнеспособными клетками, сохранившимися после обработки, может быть ферментативным путем расщеплена с получением суспензии отдельных клеток и криоконсервирована согласно описанию в настоящем документе.

[001561] Согласно некоторым вариантам реализации успешно культивированные TIL могут быть отобраны для фенотипического анализа (на CD3, CD4, CD8 и CD56) и протестированы на аутологичной опухоли, если она доступна. TIL могут считаться реактивными, если после совместного культивирования в течение ночи уровни интерферона-гамма (ИФН-γ) > 200 пг/мл и в два раза превышают фоновые. (источник: Goff, et al., J Immunother., **2010**, 33:840-847; полностью включенный посредством ссылки в настоящий документ). Согласно некоторым вариантам реализации культуры с признаками аутологичной реактивности или удовлетворительными паттернами роста могут быть выбраны для второго размножения (например, второго размножения, предусмотренного этапом D на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1B и/или фиг. 1C), в том числе второго размножения, иногда называемого быстрым размножением (REP). Согласно некоторым вариантам реализации размноженные TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, выраженной пролиферацией во время второго размножения) выбирают для дополнительного второго размножения. Согласно некоторым вариантам реализации TIL с высокой аутологичной реактивностью (например, выраженной пролиферацией во время второго размножения, предусмотренного этапом D на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1B и/или фиг. 1C), выбирают для дополнительного второго размножения в соответствии с этапом D на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001562] Согласно некоторым вариантам реализации к АКТ (адоптивный перенос клеток) у пациента не приступают сразу, например, в некоторых вариантах реализации после взятия опухоли и/или первого размножения клетки не используют немедленно. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть криоконсервированы и размморожены за 2 дня до введения пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть криоконсервированы и размморожены за 1 день до введения пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть криоконсервированы и размморожены непосредственно перед введением пациенту.

[001563] Клеточные фенотипы криоконсервированных образцов TIL в пакетах для инфузий могут быть проанализированы с помощью проточной цитометрии (*например*, FlowJo) на поверхностные маркеры CD3, CD4, CD8, CCR7 и CD45RA (BD BioSciences), а также любым из описанных здесь способов. Цитокины сыворотки можно измерить с помощью стандартных методов твердофазного иммуноферментного анализа. Подъем

уровня ИФН-g в сыворотке может быть определен как >100 пг/мл, и как по меньшей мере 4-кратно, или по меньшей мере 3-кратно, или по меньшей мере 2-кратно, или по меньшей мере 1-кратно превышающий базовые уровни ИФН-g в сыворотке. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >1000 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >200 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >250 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >300 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >350 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >400 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >450 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >500 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >550 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >600 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >650 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >700 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >750 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >800 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >850 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >900 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >950 пг/мл. Согласно некоторым вариантам реализации подъем уровня ИФН-g в сыворотке определен как >1000 пг/мл.

[001564] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, например, представленных на фиг. 1 (в частности, *например,* на фиг. 1B и/или фиг. 1C), обеспечивают впечатляющее улучшение клинической эффективности TIL. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, например, представленных на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1B и/или фиг. 1C), демонстрируют повышенную клиническую эффективность по сравнению с TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например,* на фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации способы, не описанные в настоящем документе, включают способы, называемые процессом 1C и/или «Generation 1» (Gen 1). Согласно некоторым вариантам реализации повышенную эффективность измеряют по DCR, ORR и/или другим клиническим ответам. Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению,

например, представленных на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), демонстрируют аналогичные время до развития ответа и профиль безопасности при сравнении с TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например,* фиг. 1B и/или фиг. 1C), например, процесс Gen 1.

[001565] Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-гамма (ИФН-γ) является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ в крови субъектов, получающих лечение TIL, является показателем активных TIL. Согласно некоторым вариантам реализации используют анализ активности для определения продуцирования ИФН-γ. Продуцирование ИФН-γ представляет собой еще один показатель цитотоксического потенциала. Продуцирование ИФН-γ может быть измерено путем определения цитокина ИФН-γ в крови, сыворотке или TIL ex vivo субъекта, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе описанных, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации повышение уровней ИФН-γ является показателем эффективности лечения у пациента, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно другим вариантам реализации уровни ИФН-γ повышаются в один, два, три, четыре или пять раз или более по сравнению с уровнями у не получавшего лечения пациента и/или пациента, получавшего лечение TIL, полученными способами, не описанными в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в 1 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается три раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в четыре раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается пять раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют с применением набора для ИФА ELISA Quantikine. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют ex vivo в TIL субъекта, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в крови субъекта, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в TIL сыворотки субъекта, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001566] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными другими способами, в том числе способами, примеры которых не представлены на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), такими как, например, способы, называемые процессом 1C. Согласно некоторым вариантам реализации значимо улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности. Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность относится к разнообразию Т-клеточного репертуара. Согласно некоторым вариантам реализации увеличение поликлональности может быть показателем эффективности лечения с помощью введения TIL, полученных с применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1, 2, 10, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность повышается в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в

настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 10 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

[001567] Показатели эффективности могут включать частоту контроля заболеваний (DCR), а также общую частоту ответов (ORR), известные в данной области техники, а также описанные в настоящем документе.

1. **Способы лечения рака и других заболеваний**

[001568] Композиции и способы, описанные в настоящем документе, могут применяться в способе лечения заболеваний. Согласно варианту реализации они предназначены для применения в лечении гиперпролиферативных расстройств. Они также применяться в лечении других расстройств согласно описанию здесь и в параграфах ниже.

[001569] Согласно некоторым вариантам реализации указанное гиперпролиферативное расстройство представляет собой рак. Согласно некоторым вариантам реализации указанное гиперпролиферативное расстройство представляет собой рак с солидными опухолями. Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак с солидными опухолями выбран из группы, состоящей из глиобластомы (GBM), рака желудочно-кишечного тракта, меланомы, рака яичников, рака эндометрия, рака щитовидной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), рака почек и почечноклеточного рака. Согласно некоторым вариантам реализации указанное гиперпролиферативное расстройство представляет собой злокачественное

гематологическое заболевание. Согласно некоторым вариантам реализации рак с солидными опухолями выбран из группы, состоящей из хронического лимфоцитарного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, диффузной большой В-клеточной лимфомы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, фолликулярной лимфомы и мантийноклеточной лимфомы.

[001570] Согласно некоторым вариантам реализации указанный рак имеет гипермутированный раковый фенотип. Гипермутированный рак подробно описан в источнике: Campbell, et al. (Cell, 171:1042-1056 (2017); полностью включенном посредством ссылки в настоящий документ для любых целей). Согласно некоторым вариантам реализации гипермутированные опухоли содержат от 9 до 10 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации педиатрические гипермутированные опухоли содержат 9,91 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации гипермутированные опухоли взрослого возраста содержат 9 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации усиленные гипермутированные опухоли содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации усиленные педиатрические гипермутированные опухоли содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации усиленные гипермутированные опухоли взрослого возраста содержат от 10 до 100 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации ультрамутированные опухоли содержат более 100 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации педиатрические ультрамутированные опухоли содержат более 100 мутаций на мегабазу (Мб). Согласно некоторым вариантам реализации ультрамутированные опухоли взрослого возраста содержат более 100 мутаций на мегабазу (Мб).

[001571] Согласно некоторым вариантам реализации указанные гипермутированные опухоли содержат мутации в путях репарации при репликации. Согласно некоторым вариантам реализации указанные гипермутированные опухоли содержат мутации в ассоциированных с репарацией при репликации ДНК- полимеразах. Согласно некоторым вариантам реализации указанные гипермутированные опухоли характеризуются микросателлитной нестабильностью. Согласно некоторым вариантам реализации указанный ультрамутированные опухоли содержат мутации в ассоциированных с репарацией при репликации ДНК- полимеразах и характеризуются микросателлитной нестабильностью. Согласно некоторым вариантам реализации гипермутация в опухоли коррелирует с ответом на ингибиторы иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам реализации гипермутированные опухоли резистентны к лечению ингибиторами иммунных контрольных точек. Согласно некоторым вариантам реализации лечение гипермутированных опухолей может быть проведено с применением TIL согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации гипермутация в опухоли вызвана факторами окружающей среды (внешним воздействием). Например, УФ-свет может быть первичной причиной высокого

числа мутаций при злокачественной меланоме (*см., например*, Pfeifer, G.P., You, Y.H., и Besaratinia, A. (2005). Mutat. Res. 571, 19-31.; Sage, E. (1993). Photochem. Photobiol. 57, 163-174.). В некоторых вариантах реализации гипермутация в опухоли может быть вызвана более чем 60 канцерогенами в табачном дыме в случае опухолей легких и гортани, а также других опухолей, за счет прямого воздействия мутагена (*см., например*, Pleasance, E.D., Stephens, P.J., O'Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., et al. (2010). Nature 463, 184-190). Согласно некоторым вариантам реализации гипермутация в опухоли вызвана нарушением регуляции редактирующих мРНК аполипопротеина В представителей семейства подобных каталитическим полипептидам ферментов (APOBEC), что, как было показано, приводит к повышенным уровням переходов С в Т при разнообразных типах рака (см., например, Roberts, S.A., Lawrence, M.S., Klimczak, L.J., Grimm, S.A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G.V., Carter, S.L., Saksena, G., et al. (2013). Nat. Genet. 45, 970-976). Согласно некоторым вариантам реализации гипермутация в опухоли вызвана дефектной репарацией репликации ДНК из-за мутаций, нарушающих проверку считывания, которую осуществляют основные репликативные ферменты Pol3 и Pold1. Согласно некоторым вариантам реализации гипермутация в опухоли вызвана дефектами репарации ошибочно спаренных оснований ДНК, которые связаны с гипермутацией при колоректальном, эндометриальном и других видах рака. (см., например, Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A.D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A.G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C.C., et al.; (2013). Nature 497, 67-73.; Muzny, D.M., Bainbridge, M.N., Chang, K., Dinh, H.H., Drummond, J.A., Fowler, G., Kovar, C.L., Lewis, L.R., Morgan, M.B., Newsham, I.F., et al.; (2012). Nature 487, 330-337). Согласно некоторым вариантам реализации мутации репарации при репликации ДНК также обнаруживаются при синдромах, указывающих на предрасположенность к раку, таких как конституциональная или биаллельная недостаточность репарации ошибочного спаривания (CMMRD), синдром Линча и полипоз, ассоциированный с с проверкой считывания полимеразами (PPAP).

[001572] Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак. Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой усиленный гипермутированный рак. Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой ультрамутированный рак.

[001573] Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, отличающийся тем, что предварительно проводят лечение пациента немиелоаблативной химиотерапией перед инфузией TIL в соответствии с настоящим изобретением. Согласно варианту реализации указанная немиелоаблативная химиотерапия представлена 60 мг/кг/сутки циклофосфамида на

протяжении двух дней (дней 27 и 26 до инфузии TIL) и 25 мг/м^2/сутки флударабина на протяжении 5 дней (дни 27-23 до инфузии TIL). Согласно варианту реализации после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (на 0 день) в соответствии с настоящим изобретением пациент получает внутривенную инфузию ИЛ-2 в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности.

[001574] Эффективность описанных здесь соединений и комбинаций соединений при лечении, предотвращении и/или ведении указанных заболеваний или расстройств может быть протестирована с использованием различных моделей, известных в данной области техники, которые обеспечивают методическую основу для лечения заболеваний человека. Например, модели для определения эффективности лечения рака яичников описаны, *например,* в источнике: 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 источнике: Herreros-Villanueva, et al., World J. Gastroenterol. **2012,** 18, 1286-1294. Модели для определения эффективности лечения рака молочной железы описаны, *например,* в источнике: Fantozzi, Breast Cancer Res. **2006,** 8, 212. Модели для определения эффективности лечения меланомы описаны, *например,* в источнике: Damsky, et al., Pigment Cell & Melanoma Res. **2010,** 23, 853-859. Модели для определения эффективности лечения рака легкого описаны, *например,* в источнике: Meuwissen, et al., Genes & Development, **2005,** 19, 643-664. Модели для определения эффективности лечения рака легкого описаны, *например,* в источниках: Kim, Clin. Exp. Otorhinolaryngol. **2009,** 2, 55-60; и Sano, Head Neck Oncol. **2009,** 1, 32.

[001575] Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-гамма (ИФН-γ) является показателем эффективности лечения гиперпролиферативного расстройства. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ в крови субъектов, получающих лечение TIL, является показателем активных TIL. Согласно некоторым вариантам реализации используют анализ активности для определения продуцирования ИФН-γ. Продуцирование ИФН-γ представляет собой еще один показатель цитотоксического потенциала. Продуцирование ИФН-γ может быть измерено путем определения уровней цитокина ИФН-γ в крови субъекта, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению, в в том числе согласно описанию, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные предложенным способом, обеспечивают повышенные уровни ИФН-γ в крови субъектов, получающих лечение TIL, полученных предложенным способом, по сравнению с субъектами, получающими лечение TIL, полученными с применением способов, называемых процессом Gen 3, согласно иллюстративному примеру на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C) и описанию в тексте настоящей заявки. Согласно некоторым вариантам реализации повышение уровней ИФН-γ является показателем эффективности лечения у пациента, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации уровень ИФН-γ повышается в один, два, три, четыре

или четыре раза или более чем по сравнению с не получавшим лечение пациентом и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными способами, не описанными в настоящем документе, включая способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в 1 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается три раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается в четыре раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации секреция ИФН-γ повышается пять раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют с применением набора для ИФА ELISA Quantikine. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют с применением набора для ИФА ELISA Quantikine. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют ex vivo в TIL от пациента, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в крови у пациента, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации ИФН-γ измеряют в сыворотке у пациента, получающего лечение TIL, полученными с применением способов согласно настоящему изобретению.

[001576] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные с применением способов согласно настоящему изобретению, в том числе описанных, например, на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), демонстрируют повышенную поликлональность по сравнению с TIL, полученными другими способами, в

том числе не представленными на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), такими как, например, способы, называемые процессом 1C. Согласно некоторым вариантам реализации значимо улучшенная поликлональность и/или повышенная поликлональность является показателем эффективности лечения и/или повышенной клинической эффективности лечения ракового заболевания. Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность относится к разнообразию репертуара Т-клеток. Согласно некоторым вариантам реализации увеличение поликлональности может быть показателем эффективности лечения применительно к введению TIL, полученных в применением способов согласно настоящему изобретению. Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1, 2, 10, 100, 500 или 1000 раз по сравнению с TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность повышается в два раза по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 10 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 100 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 500 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Согласно некоторым вариантам реализации поликлональность увеличивается в 1000 раз по сравнению с пациентом, не получавшим лечения, и/или по сравнению с пациентом, получавшим лечение TIL, полученными с применением способов, не описанных в настоящем документе, включая, например, способы, не представленные на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C).

2. **Способы совместного введения**

[001577] Согласно некоторым вариантам реализации TIL, полученные согласно описанию в настоящем документе, включая, например TIL, полученные способом, описанным как этапы A-F на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C), могут быть введены в комбинации с одним или более регуляторами иммунных контрольных точек, такими как антитела, описанные ниже. Например, антитела, нацеленные на PD-1 и подходящие для совместного введения с TIL согласно настоящему изобретению, включают, *например,* однако не ограничиваясь перечисленными, ниволумаб (BMS-936558, Bristol-Myers Squibb; опдиво (Opdivo®)), пембролизумаб (ламбролизумаб, MK03475 или MK-3475, Merck; кейтруда (Keytruda®)), гуманизированные антитело против PD-1 JS001 (ShangHai JunShi), моноклональное антитело против PD-1 TSR-042 (Tesaro, Inc.), пидилизумаб (mAb против PD-1 CT-011, Medivation), моноклональное антитело против PD-1 BGB-A317 (BeiGene), и/или антитело против PD-1 SHR-1210 (ShangHai HengRui), моноклональное антитело человека REGN2810 (Regeneron), моноклональное антитело человека MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb) и/или гуманизированное IgG4 антитело против PD-1 PDR001 (Novartis). Согласно некоторым вариантам реализации указанное PD-1 антитело происходит из клона: RMP1-14 (IgG крысы) - BioXcell кат. № BP0146. Другие подходящие антитела для применения в способах совместного введения с TIL, полученными в соответствии с этапами A-F согласно описанию в настоящем документе, представлены антителами против PD-1, раскрытыми в патенте США № 8008449, включенном в настоящем документе посредством ссылки. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело или его антигенсвязывающая часть специфически связывается с PD-L1 и ингибирует его взаимодействие с PD-1, таким образом повышая иммунную активность. Любые антитела, известные в данной области техники, которые связываются с PD-L1 и нарушают взаимодействие между PD-1 и PD-L1, и стимулируют противоопухолевый иммунный ответ, подходят для применения в способах совместного введения с TIL, полученными в соответствии с этапами A-F согласно описанию в настоящем документе. Например, антитела, которые нацелены на PD-L1 и проходят клинические испытания, включают BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) и MPDL3280A (Genentech). Другие подходящие антитела, нацеленные на PD-L1, раскрыты в патенте США № 7943743, который включен в настоящий документ посредством ссылки. Специалисту в данной области техники будет понятно, что любое антитело, которое связывается с PD-1 или PD-L1, нарушает взаимодействие PD-1/PD-L1 и стимулирует противоопухолевый иммунный ответ, подходит для применения в способах совместного введения с TIL, полученными в соответствии с этапами A-F согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации субъекту, которому вводят комбинацию TIL, полученных в соответствии с этапами A-F, совместно вводят антитело против PD-1, если тип рака у указанного пациента рефрактерен к введению антитела против PD-1 по отдельности. Согласно некоторым вариантам реализации указанному пациенту вводят TIL

в комбинации с антителом против PD-1, если указанный пациент страдает рефрактерной меланомой. Согласно некоторым вариантам реализации указанному пациенту вводят TIL в комбинации с антителом против PD-1, если указанный пациент страдает немелкоклеточной карциномой легкого (НМРЛ).

3. **Необязательное проведение прекондиционирования пациентов путем лимфодеплеции**

[001578] Согласно варианту реализации настоящее изобретение включает способ лечения рака с применением популяции TIL, отличающийся тем, что предварительно проводят лечение пациента немиелоаблативной химиотерапией перед инфузией TIL в соответствии с настоящим изобретением. Согласно варианту реализации предусмотрена популяция TIL для применения при лечении рака у пациента, который получал предварительную немиелоаблативную химиотерапию. Согласно варианту реализации указанная популяция TIL предназначена для введения путем инфузии. Согласно варианту реализации указанная немиелоаблативная химиотерапия представлена 60 мг/кг/сутки циклофосфамида на протяжении двух дней (дни 27 и 26 до инфузии TIL) и 25 мг/м^2/сутки флударабина на протяжении 5 дней (дни 27-23 до инфузии TIL). Согласно варианту реализации после немиелоаблативной химиотерапии и инфузии TIL (на 0 день) в соответствии с настоящим изобретением пациент получает внутривенную инфузию ИЛ-2 (альдеслейкин, коммерчески доступный под наименованием пролейкин) внутривенно в дозе 720000 МЕ/кг каждые 8 часов до физиологической толерантности. Согласно некоторым вариантам реализации указанная популяция TIL предназначена для применения в лечении рака в комбинации с ИЛ-2, причем указанный ИЛ-2 вводят после введения популяции TIL.

[001579] Экспериментальные данные показывают, что лимфодеплеция перед адоптивным переносом опухоль-специфических Т-лимфоцитов играет ключевую роль в повышении эффективности лечения за счет элиминации регуляторных Т-клеток и конкурирующих элементов иммунной системы («цитокиновых стоков»). Соответственно, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения используется этап лимфодеплеции у пациента (иногда также называемый «иммуносупрессивным кондиционированием») до введения TIL согласно настоящему изобретению.

[001580] Как правило, лимфодеплеция достигается путем введения флударабина или циклофосфамида (активная форма называется мафосфамидом) и их комбинаций. Такие способы описан в источниках: 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, каждый из которых полностью включен посредством ссылки в настоящий документ.

[001581] Согласно некоторым вариантам реализации флударабин вводят в концентрации 0,5 мкг/мл -10 мкг/мл флударабина. Согласно некоторым вариантам реализации флударабин вводят в концентрации 1 мкг/мл флударабина. Согласно некоторым вариантам реализации лечение флударабином проводят в течение 1 дня, 2

дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или дольше. Согласно некоторым вариантам реализации флударабин вводят в дозировке 10 мг/кг/сутки, 15 мг/кг/сутки, 20 мг/кг/сутки, 25 мг/кг/сутки, 30 мг/кг/сутки, 35 мг/кг/сутки, 40 мг/кг/сутки или 45 мг/кг/сутки. Согласно некоторым вариантам реализации лечение флударабином проводят в течение 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. Согласно некоторым вариантам реализации лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. Согласно некоторым вариантам реализации лечение флударабином проводят в течение 4-5 дней в дозе 25 мг/кг/сутки.

[001582] Согласно некоторым вариантам реализации мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации 0,5 мкг/мл -10 мкг/мл при введении циклофосфамида. Согласно некоторым вариантам реализации мафосфамид, активную форму циклофосфамида, получают в концентрации 1 мкг/мл при введении циклофосфамида. Согласно некоторым вариантам реализации лечение циклофосфамидом вводят на протяжении 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней или 7 дней, или дольше. Согласно некоторым вариантам реализации циклофосфамид вводят в дозировке 100 мг/м^2/сутки, 150 мг/м^2/сутки, 175 мг/м^2/сутки, 200 мг/м^2/сутки, 225 мг/м^2/сутки, 250 мг/м^2/сутки, 275 мг/м^2/сутки или 300 мг/м^2/сутки. Согласно некоторым вариантам реализации циклофосфамид вводят внутривенно *(т.е.* в/в) Согласно некоторым вариантам реализации лечение циклофосфамидом проводят на протяжении 2-7 дней в дозе 35 мг/кг/сутки. Согласно некоторым вариантам реализации лечение циклофосфамидом проводят на протяжении 4-5 дней в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в. Согласно некоторым вариантам реализации лечение циклофосфамидом проводят на протяжении 4 дней в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в.

[001583] Согласно некоторым вариантам реализации лимфодеплецию осуществляют путем совместного введения флударабина и циклофосфамида пациенту. Согласно некоторым вариантам реализации флударабин вводят в дозе 25 мг/м^2/сутки в/в и циклофосфамид вводят в дозе 250 мг/м^2/сутки в/в на протяжении 4 дней.

[001584] Согласно варианту реализации лимфодеплецию осуществляют путем введения циклофосфамида в дозе, составляющей 60 мг/м^2/сутки, на протяжении двух дней, с последующим введением флударабина в дозе, составляющей 25 мг/м^2/сутки, в течение пяти дней.

4. **Схемы ИЛ-2**

[001585] Согласно варианту реализации схема ИЛ-2 включает схему с высокими дозами ИЛ-2, отличающуюся тем, что указанная схема с высокими дозами ИЛ-2 содержит альдеслейкин, или его биоаналог или вариант, который вводят внутривенно начиная со следующего дня после введения терапевтически эффективной части терапевтической популяции TIL, отличающийся тем, что альдеслейкин, или его биоаналог или вариант вводят в дозе, составляющей 0,037 мг/кг или 0,044 мг/кг МЕ/кг (массы тела пациента) с применением 15-минутных болюсных внутривенных инфузий каждые восемь часов до толерантности, максимум 14 доз. После 9 дней отдыха указанный график может быть

повторен с введением еще 14 доз, в общей сложности максимум 28 доз.

[001586] Согласно варианту реализации схема с ИЛ-2 включает схему с постепенным снижением количества ИЛ-2. Схемы с постепенным снижением количества ИЛ-2 были описаны в источниках: O'Day, et al., J. Clin. Oncol. **1999,** 17, 2752-61 и Eton, et al., Cancer **2000,** 88, 1703-9, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Согласно варианту реализации схема с постепенным снижением количества ИЛ-2 включает введение внутривенно 18×10^6 МЕ/м^2 в течение 6 часов, с последующим введением внутривенно 18×10^6 МЕ/м^2 в течение 12 часов, с последующим 18×10^6 МЕ/м^2 введением внутривенно в течение 24 часов, с последующим введением внутривенно $4{,}5 \times 10^6$ МЕ/м^2 в течение 72 часов. Указанный цикл лечения может быть повторен каждые 28 дней, в общей сложности возможно максимум четыре цикла. Согласно варианту реализации схема с постепенным снижением количества ИЛ-2 включает 18 млн МЕ/м^2 на 1 день, 9 млн МЕ/м^2 на 2 день, и 4,5 млн МЕ/м^2 на 3 и 4 дни.

[001587] Согласно варианту реализации указанная схема ИЛ-2 включает введение пегилированного ИЛ-2 каждые 1, 2, 4, 6, 7, 14 дней или 21 день в дозе, составляющей от 0,10 мг/сутки до 50 мг/сутки.

5. **Адоптивный перенос клеток**

[001588] Адоптивный перенос клеток (АПК) является эффективной формой иммунотерапии и включает перенос иммунных клеток, обладающих противоопухолевой активностью, в организм пациентов, страдающих раком. АСТ представляет собой способ лечения, включающий идентификацию in vitro лимфоцитов с противоопухолевой активностью, размножение указанных клеток in vitro с получением значительных их количеств и инфузию указанных клеток в организм хозяина-носителя рака. Лимфоциты, используемые для адоптивного переноса, могут происходить из стромы резецированных опухолей (инфильтрирующих опухоль лимфоцитов, или TIL). TIL для АПК могут быть получены согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации указанные TIL получают, например, в соответствии со способом, представленным на фиг. 1 (в частности, *например*, фиг. 1B и/или фиг. 1C). Они также могут происходить из крови, если они были генетически сконструированы для экспрессии противоопухолевых Т-клеточных рецепторов (TCR) или химерных антигенных рецепторов (CAR), обогащены смешанными культурами лимфоцитарных опухолевых клеток (MLTC) или клонированы с использованием аутологичных антигенпрезентирующих клеток и пептидов, происходящие из опухоли. АПК, при котором лимфоциты для инфузии происходят из организма хозяина-носителя рака, называют аутологичным АПК. Публикация США № 2011/0052530, которая полностью включена посредством ссылки в настоящий документ в части описания способов, относится к способу проведения адоптивной клеточной терапии, способствующей регрессу рака, в первую очередь для лечения пациентов, страдающих метастатической меланомой. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут быть введены согласно описанию в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации TIL могут

быть введены в виде одной дозы. Такое введение может осуществляться путем инъекции, *например*, внутривенной инъекции. Согласно некоторым вариантам реализации TIL и/или цитотоксические лимфоциты могут вводиться в нескольких дозах. Дозирование может происходить один, два, три, четыре, пять, шесть или более шести раз в год. Дозирование может происходить один раз в месяц, один раз в две недели, один раз в неделю или каждые два дня. Введение TIL и/или цитотоксических лимфоцитов может продолжаться, пока это необходимо.

6. **Дополнительные способы лечения**

[001589] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях,.

[001590] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях.

[001591] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, описанный в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что перед введением терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, или терапевтически эффективной дозировки композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, у указанного пациента используют схему немиелоаблативной лимфодеплеции.

[001592] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта субъекта с раком описанный в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение 2 дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[001593] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, описанный в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, модифицированный так, чтобы дополнительно включать этап лечения указанного субъекта по схеме с высокими дозами ИЛ-2, начиная со следующего дня после введения клеток TIL указанному субъекту.

[001594] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанная схема с высокими дозами ИЛ-2 включает 600 000 или 720 000 МЕ/кг, которые вводят в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые

восемь часов до толерантности.

[001595] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

[001596] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, рак яичников, рак эндометрия, рак щитовидной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызываемый папилломавирусом человека, рак головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластому (в том числе GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почек или почечноклеточный рак.

[001597] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, ПКРГШ, рак шейки матки, НМРЛ, глиобластому (в том числе GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

[001598] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому.

[001599] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

[001600] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

[001601] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

[001602] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

[001603] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001604] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

[001605] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ лечения субъекта с раком, согласно описанию в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[001606] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, для применения в способе лечения субъекта с раком, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки указанной терапевтической популяции TIL.

[001607] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях в способе лечения субъекта с раком, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки указанной композиции TIL.

[001608] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих указанных случаях, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов в соответствующих указанных случаях, модифицированная таким образом, что перед введением указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов в соответствующих указанных случаях, у указанного пациента используют схему немиелоаблативной лимфодеплеции

[001609] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки в течение пяти дней.

[001610] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, или композиция TIL, описанная

в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная так, чтобы дополнительно предусматривать этап лечения пациента по схеме с высокими дозами ИЛ-2, начиная со следующего дня после введения клеток TIL указанному пациенту.

[001611] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанная схема с высокими дозами ИЛ-2 включает 600 000 или 720 000 МЕ/кг, которые вводят в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

[001612] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

[001613] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, рак яичников, рак эндометрия, рак щитовидной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызываемый папилломавирусом человека, рак головы и шеи (в том числе плоскоклеточную карциному головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластому (в том числе GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почек или почечноклеточный рак.

[001614] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, ПКРГШ, рак шейки матки, НМРЛ, глиобластому (в том числе GBM), и рак желудочно-кишечного тракта.

[001615] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированный таким образом, что указанный рак представляет собой меланому.

[001616] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из

предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

[001617] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

[001618] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

[001619] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

[001620] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001621] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

[001622] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложена терапевтическая популяция TIL или композиция TIL, описанная в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированная таким образом, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

[001623] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, в способе лечения рака у субъекта, включающем введение указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки указанной терапевтической популяции TIL.

[001624] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, в способе лечения рака у субъекта, включающее введение указанному субъекту терапевтически эффективной

дозировки указанной композиции TIL.

[001625] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, в способе лечения рака у субъекта, включающее использование у указанного субъекта схемы немиелоаблативной лимфодеплеции и с последующим введением указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, или терапевтически эффективной дозировки композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях.

[001626] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов в соответствующих указанных случаях, модифицированное таким образом, что перед введением указанному субъекту терапевтически эффективной дозировки терапевтической популяции TIL или терапевтически эффективной дозировки композиции TIL у указанного пациента используют схему немиелоаблативной лимфодеплеции.

[001627] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих указанных случаях, модифицированный таким образом, что схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе 60 мг/м^2/сутки на протяжении двух дней с последующим введением флударабина в дозе 25 мг/м^2/сутки на протяжении пяти дней.

[001628] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих случаях, или применение композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, в соответствующих случаях, модифицированной так, чтобы дополнительно включать этап лечения пациента по схеме с высокими дозами ИЛ-2, начиная со следующего дня после введения клеток TIL указанному пациенту.

[001629] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что схема с высокими дозами ИЛ-2 включает 600 000 или 720 000 МЕ/кг, которые вводят в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

[001630] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях,

модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

[001631] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, рак яичников, рак эндометрия, рак щитовидной железы, рак ободочной и прямой кишки, рак шейки матки, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак, вызываемый папилломавирусом человека, рак головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластому (в том числе GBM), рак желудочно-кишечного тракта, рак почек или почечноклеточный рак.

[001632] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой меланому, ПКРГШ, рак шейки матки, НМРЛ, глиобластому (в том числе GBM) и рак желудочно-кишечного тракта.

[001633] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой меланому.

[001634] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

[001635] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

[001636] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

[001637] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

[001638] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения

предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

[001639] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

[001640] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложено применение терапевтической популяции TIL или композиции TIL, описанной в любом из предыдущих параграфов, для применения в соответствующих случаях, модифицированной таким образом, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

ПРИМЕРЫ

[001641] Варианты реализации, предусмотренные настоящим изобретением, описаны ниже на примерах. Указанные примеры приведены исключительно с целью иллюстрации, и описанное в настоящем документе изобретение никоим образом не следует истолковывать как ограниченное указанными примерами, напротив, подразумевается, что оно охватывает все варианты, которые будут очевидны после изучения изложенных в настоящем документе принципов.

ПРИМЕР 1: ПРИГОТОВЛЕНИЕ СРЕДЫ ДЛЯ ПРОЦЕССОВ PRE-REP И REP

[001642] В указанном примере описана процедура приготовления среды для тканевых культур для использования в протоколах, включающих культивирование инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученных из различных типов опухолей, включая, без ограничения, метастатическую меланому, плоскоклеточный рак головы и шеи (HNSCC), карциному яичников карциному молочной железы с тройным отрицательным фенотипом и аденокарциному легкого. Указанную среду можно использовать для получения любых TIL, описанных в настоящей заявке и в примерах.

Приготовление CM1

[001643] Из холодильной камеры достают и нагревают на водяной бане при 37°C следующие реагенты: (RPMI1640, AB сыворотка человека, 200 мМ L-глутамин). Готовят среду CM1 в соответствии с таблицей 19 ниже путем добавления каждого из ингредиентов в верхнюю секцию блока фильтра с размером пор 0,2 мкм, с учетом фильтруемого объема. Хранят при 4°C.

ТАБЛИЦА 19: Приготовление CM1

Ингредиент	Конечная концентрация	Итоговый объем 500 мл	Итоговый объем ИЛ
RPMI1640	NA	450 мл	900 мл

АВ сыворотка человека, инактивированная нагреванием, 10%	50 мл	100 мл	
200 мМ L-глутамин	2 мМ	5 мл	10 мл
55 мМ BME	55 мкМ	0.5 мл	1 мл
50мг/мл сульфата гентамицина	50 мкг/мл	0,5 мл	1 мл

[001644] В день использования предварительно нагревают необходимое количество СМ1 на водяной бане при 37°С и добавляют 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001645] Дополнительные добавки - по мере необходимости в соответствии с таблицей 20.

ТАБЛИЦА 20: Дополнительные добавки для СМ1, по мере необходимости.

Добавка	**Стоковая концентрация**	**Разведение**	**Конечная концентрация**
GlutaMAX™	200 мМ	1:100	2 мМ
Пенициллин/стрептомицин	10000 Ед/мл пенициллина 10000 мкг/мл стрептомицина	1:100	100 Ед/мл пенициллина 100 мкг/мл стрептомицина
Амфотерицин В	250 мкг/мл	1:100	2,5 мкг/мл

Приготовление СМ2

[001646] Вынимали приготовленную СМ1 из холодильника или готовили свежую СМ1, как описано в таблице 19 выше. Вынимали AIM-V® из холодильника и готовили нужное количество СМ2 путем смешивания подготовленной СМ1 с равным объемом AIM-V® в стерильном сосуде для среды. Добавляли 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в среду СМ2 в день использования. Готовили достаточное количество СМ2 с 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в день использования. Маркировали сосуд со средой СМ2, указывая название, инициалы изготовителя, дату фильтрации/приготовления, двухнедельный срок годности; и помещали на хранение при 4°С до тех пор, пока среда не понадобится для культивирования ткани.

Приготовление СМ3

[001647] Готовили СМ3 в день, когда она была нужна. Состав СМ3 совпадал с составом AIM-V® с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 в день применения. Готовили достаточное количество СМ3 для нужд эксперимента путем добавления стокового раствора ИЛ-2 непосредственно в сосуд или пакет с AIM-V. Тщательно смешивали,

аккуратно встряхивая. На сосуд наносили маркировку «3000 МЕ/мл ИЛ-2» непосредственно после добавления в AIM-V. При наличии избытка CM3 среду хранили при 4°C в сосудах с указанием названия среды, инициалов изготовителя, даты приготовления среды и срока годности (7 дней после приготовления). Утилизировали среду с добавлением ИЛ-2 через 7 дней хранения при 4°C.

Приготовление CM4

[001648] Состав CM4 совпадал с составом CM3, дополнительно вносили 2 мМ GlutaMAX™ (конечная концентрация). На каждый литр CM3 добавляли по 10 мл 200 мМ GlutaMAX™. Готовили достаточное количество CM4 для нужд эксперимента путем добавления стокового раствора ИЛ-2 и стокового раствора GlutaMAX™ непосредственно в сосуд или пакет с AIM-V. Тщательно смешивали, аккуратно встряхивая. На сосуд наносили маркировку «3000 ИЛ/без ИЛ-2 и GlutaMAX» непосредственно после добавления в AIM-V. При наличии избытка CM4 ее хранят в сосудах при 4°C с указанием названия среды, отметкой «GlutaMAX» и сроком годности (7 дней после приготовления). Утилизировали среду с добавлением ИЛ-2 через 7 дней хранения при 4°C.

ПРИМЕР 2: ПРИМЕНЕНИЕ КОКТЕЙЛЯ ЦИТОКИНОВ ИЛ-2, ИЛ-15 И ИЛ-21

[001649] В указанном примере описано применение цитокинов ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, которые служат в качестве дополнительных факторов роста Т-клеток, в комбинации с процессом TIL согласно примерам A-G.

[001650] С применением процессов, описанных в настоящем документе, культивировали TIL из опухолей ободочной и прямой кишки, меланомы, шейки матки, рака молочной железы с тройным отрицательным фенотипом, опухолей легких и почек в присутствии ИЛ-2 в одной экспериментальной группе и в присутствии комбинации ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 вместо ИЛ-2 в другой группе на момент инициации культуры. После завершения пре-REP в культурах оценивали размножение, фенотип, функцию (CD107a+ и ИФН-γ) и репертуар TCR Vβ. ИЛ-15 и ИЛ-21 описаны в тексте настоящего документа, а также у Gruijl с соавторами, ИЛ-21 способствует размножению CD27+CD28+ инфильтрирующих опухоль лимфоцитов с высоким цитотоксическим потенциалом и низким уровнем параллельного размножения регуляторных Т-клеток, см. Santegoets, S. J., J Transl Med., **2013,** 11:37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/).

[001651] Полученные результаты показали, что усиленное размножение TIL (>20%), как $CD4^+$, так и $CD8^+$ клеток, в условиях обработки ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21 наблюдается при различных гистологических исследованиях, в отличие от условий обработки ИЛ-2 по отдельности. Наблюдался некоторый сдвиг в сторону преимущественно CD8+популяции со сдвигом репертуара TCR Vβ у TIL, полученных из культур, обработанных ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, по сравнению с культурами, обработанными только ИЛ-2. Уровни как ИФН-γ, так и CD107a были повышены в TIL, обработанных ИЛ-2, ИЛ-15 и ИЛ-21, по сравнению с TIL, обработанными только ИЛ-2.

ПРИМЕР 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТОКОВОГО РАСТВОРА ИЛ-2 (CELLGENIX)

[001652] В указанном примере описан процесс растворения очищенного

лиофилизированного рекомбинантного интерлейкина-2 человека с получением стоковых образцов, подходящих для применения в последующих протоколах культивирования тканей, в том числе любых протоколах, описанных в настоящем документе и в примерах, в том числе в протоколах, включающих применение рчИЛ-2.

Процедура

[001653] Готовили 0,2% раствор уксусной кислоты (HAc). Переносили 29 мл стерильной воды в коническую пробирку объемом 50 мл. В коническую пробирку объемом 50 мл добавляли 1H уксусную кислоту. Тщательно смешивали, переворачивая пробирку 2-3 раза. Стерилизовали раствор HAc путем фильтрации с применением фильтра Steriflip.

[001654] Готовили 1% раствор ЧСА в ФСБ. Добавляли 4 мл 25% ЧСА стокового раствора в 96 мл ФСБ в блок стерильной фильтрации объемом 150 мл. Фильтровали раствор. Хранили при 4°C. Заполняли формы для каждого приготовленного флакона с рчИЛ-2.

[001655] Готовили стоковый раствор рчИЛ-2 (конечная концентрация 6×10^6 МЕ/мл). Каждая партия рчИЛ-2 отличалась, и требовалась информация, содержащаяся в аналитическом паспорте производителя (COA), такая как: 1) масса рчИЛ-2 на флакон (мг), 2) удельная активность рчИЛ-2 (МЕ/мг) и 3) Рекомендуемый объем для восстановления 0,2% раствора HAc (мл).

[001656] Рассчитывали объем 1% ЧСА, необходимый для партии рчИЛ-2, используя уравнение, приведенное ниже:

$$\left(\frac{Vial\ Mass\ (mg)\ x\ Biological\ Activity\ (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

[001657] Например, согласно COA для партии CellGenix рчИЛ-2 10200121, удельная активность для флакона 1 мг составляет 25×10^6 МЕ/мг. Рекомендовано восстановление рчИЛ-2 в 2 мл 0,2% HAc.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[001658] Протирали резиновую пробку флакона с ИЛ-2 спиртовой салфеткой. С помощью иглы калибра 16G, присоединенной к шприцу объемом 3 мл, вводили рекомендуемый объем 0,2% HAc во флакон. При извлечении иглы следует избегать смещения пробки. Флакон переворачивали 3 раза и взбалтывали до полного растворения порошка. Осторожно снимали пробку и помещали на спиртовую салфетку. Добавляли во флакон рассчитанный объем 1% ЧСА.

[001659] Хранение раствора рчИЛ-2. Для кратковременного хранения (<72 часов)

хранили во флаконе при 4 °C. Для длительного хранения (>72 часов) флакон разделяют на аликвоты меньшего объема и хранят в криопробирках при -20°C до использования. Избегали повторных циклов замораживания/размораживания. Регистрировали срок годности: 6 месяцев с даты приготовления. Маркировка для рчИЛ-2 включала название производителя и номер по каталогу, номер партии, срок годности, инициалы оператора, концентрацию и объем аликвот.

ПРИМЕР 4: ПРОЦЕСС КРИОКОНСЕРВАЦИИ

[001660] В указанном примере описан способ процесса криоконсервации TIL, полученных с помощью сокращенной закрытой процедуры, описанной в примере G, с использованием системы с контролируемой скоростью замораживания CryoMed Controlled Rate Freezer, модель 7454 (Thermo Scientific).

[001661] Использовалось следующее оборудование: алюминиевый кассетодержатель (совместимый с пакетами для замораживания CS750), кассеты для криохранения для пакетов объемом 750 мл, резервуар с жидким азотом низкого давления (22 фунта на квадратный дюйм), холодильник, термоэлектрический датчик (ленточного типа для пакетов) и пакеты для замораживания CryoStore CS750 (OriGen Scientific).

[001662] Процесс замораживания обеспечивал скорость 0,5°C от нуклеации до -20°C и скорость охлаждения 1°C в минуту до конечной температуры -80 °C. Параметры программы были следующими: этап 1 - выдерживание при 4 °C; этап 2: от 1,0 °C/мин (температура образца) до -4 °C; этап 3: от 20,0 °C/мин (температура камеры) до -45 °C; этап 4: от 10,0 °C/мин (температура камеры) до -10,0 °C; этап 5: от 0,5 °C/мин (температура камеры) до -20 °C; и этап 6: от 1,0 °C/мин (температура образца) до -80 °C.

ПРИМЕР 5: ПРИМЕР ПРОЦЕССА GEN 3

[001663] В указанном примере приведено сравнение процессов Gen 2 и Gen 3. В указанном примере описано описывается разработка надежной платформы для размножения TIL. Модификации процесса Gen 2 снижают риски и оптимизируют процесс получения за счет снижения эпизодов вмешательства оператора, сокращения общего времени производства, оптимизации использования реагентов и упрощения гибкого, полузакрытого и полуавтоматического процесса получения клеток, пригодного для высокопроизводительного производства в коммерческих масштабах.

[001664] TIL, получаемые в процессах Gen 2 и Gen 3, состоят из аутологичных TIL, полученных от индивидуального пациента путем хирургической резекции опухоли, а затем размноженных ex vivo. Этап подготовительного первого размножения процесса Gen 3 был представлен культивированием клеток в присутствии интерлейкина-2 (ИЛ-2) и моноклонального антитела OKT3, которое нацелено на Т-клеточный корецептор CD3, на скаффолде из облученных мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК).

[001665] Получение продуктов TIL Gen 2 состояло из двух фаз: 1) фаза до быстрого размножения (Пре-REP) и 2) протокол быстрого размножения (REP). В ходе пре-REP резецированные опухоли разрезали на ≤ 50 фрагментов по 2-3 мм в каждом измерении, которые культивировали в содержащей сыворотку культуральной среде (среда RPMI 1640

с добавлением 10% HuSAB) с 6000 МЕ/мл интерлейкина-2 (ИЛ-2) на протяжении периода, составляющего 11 дней. На 11 день TIL собирали и переходили к их вторичному размножению REP большого масштаба. REP состоит из активации $\leq 200\times10^6$ жизнеспособных клеток с фазы пре-REP в совместной культуре с 5×10^9 облученных аллогенных фидерных клеток МКПК, нагруженной 150 мкг моноклонального антитела против CD3 (OKT3), в 5л CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл рчИЛ-2, на протяжении 5 дней. На 16 день объем культуры снижают на 90% и фракцию клеток разделяют, распределяя по нескольким флаконам G-REX-500, с плотностью $\geq$ 1×10^9 жизнеспособных лимфоцитов/флакон, и доводят объем до 5 л средой CM4. Инкубируют TIL еще 6 дней. Продукт REP собирают на 22 день, промывают, готовят итоговый состав и криоконсервируют перед отправкой при -150°C в клинический центр для инфузии.

[001666] Получение продуктов TIL Gen 3 состояло из трех фаз: 1) протокол подготовительного первого размножения 2) протокол быстрого второго размножения (также называемый фазой быстрого размножения, или REP) и 3) разделение на субкультуры. Для получения TIL для проведения подготовительного первого размножения резецированную опухоль разрезали на $\leq$ 120 фрагментов, по 2-3 мм в каждом измерении. На 0 день подготовительного первого размножения фидерный слой из приблизительно $2,5 \times 10^8$ аллогенных облученных фидерных клеток МКПК, нагруженных OKT-3, размещали на поверхности площадью приблизительно 100 $см^2$ в каждом из 3 сосудов 100 MCS. Фрагменты опухоли распределяли по указанным 3 сосудам 100MCS, каждый из которых содержал 500 мл культуральной среды с сывороткой CM1 и 6000 МЕ/мл интерлейкина-2 (ИЛ-2) и 15 мкг OKT-3, и культивировали на протяжении периода 7 дней. На 7 день инициировали REP путем включения дополнительного слоя фидерных клеток из приблизительно 5×10^8 аллогенных облученных фидерных клеток МКПК, нагруженных OKT-3, в культуру фрагментов опухоли в каждом из 3 сосудов 100 MCS, и культивирования с 500 мл культуральной среды CM2 и 6000 МЕ/мл ИЛ-2 и 30 мкг OKT-3. Инициацию REP усиливали путем активации всей культуры подготовительного первого размножения в том же сосуде, используя закрытую систему переноса жидкости для перемещения нагруженных OKT3 фидерных клеток в сосуд 100MCS. В случае Gen 3, масштабирование или разделение TIL включало этапы процесса, когда культуру клеток масштабировали, полностью перенося в больший сосуд через закрытую систему переноса жидкостей (из флакона 100 M во флакон 500 M) и добавляли дополнительно 4 л среды CM4. Клетки REP собирали на 16 день, промывали, готовили итоговый состав и криоконсервировали перед транспортировкой при -150°C в клинический центр для инфузии.

[001667] В целом процесс Gen 3 представляет собой менее продолжительную, лучше масштабируемую и легко модифицируемую платформу для размножения, которая может обеспечивать надежность при производстве и сопоставимость процессов.

Таблица 21: Сравнение процесса получения в примере Gen 2 и примере Gen 3.

Этап	Процесс (Gen 2)	Процесс (Gen 3)
Пре-REP - день 0	До 50 фрагментов/ 1-G-Rex 100MCS - 11 дней В 1 л среды CM1 + ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	Целая опухоль, до 120 фрагментов, равномерно распределенных по 3 флаконам. 1 флакон: 1-60 фрагментов 2 флакона: 61-89 фрагментов 3 флакона 90-120 фрагментов 7 дней в 200-500 мл среды CM1 + ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) 2,5 × 10^8 фидерных клеток /флакон Необязательно 15 мкг OKT-3/флакон
Инициация REP	Переход непосредственно к REP- день 11- <200e^6 TIL (1)G-Rex 500MCS в 5 л среды CM2 ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) 5 × 10^9 фидерных клеток 150 мкг OKT-3	Переход непосредственно к REP- день 7- все клетки TIL- тот же флакон G-Rex 100MCS Добавляют 500 мл среды CM2 ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) 5 × 10^8 фидерных клеток/флакон 30 мкг OKT-3/флакон
Размножение TIL или Масштабирование	Снижение объема и разделение клеточной фракции - до 5 флаконов G-REX 500MCS 4,5 л среды CM4+ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) ≥ 1 × 10^9 TVC/флакон Разделение, день 16	Перенос содержимого каждого G-REX 100MCS(1 л) в 1 G-REX 500MCS Добавляют 4 л среды CM4 +ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) Масштабирование на день 9-11

Сбор	Сбор, день 22, LOVO-устройство для автоматизированного промывания клеток	Сбор, день 16 LOVO- устройство для автоматизированного промывания клеток
Получение итогового состава	Криоконсервированный Продукт 300МЕ/мл ИЛ2- CS10 в LN_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ-2-CS10 в LN_2, несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дня**	**16 дней**

[001668] На день 0 для обоих процессов опухоль 3 раза промывали и фрагменты рандомизировали и разделяли на два пула; по одному пулу на процесс. Для процесса Gen 2 фрагменты переносили в один флакон GREX 100MCS с 1 л среды CM1, содержащей 6000МЕ/мл рчИЛ-2. Для процесса Gen 3 фрагменты переносили в один флакон GREX100MCS с 200-500 мл CM1, содержащей 6000МЕ/мл рчИЛ-2, необязательно 15 мкг ОКТ-3 и $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток.

[001669] Для инициации REP TIL высевали в разные дни, в соответствии с каждым процессом. Для процесса Gen 2, в ходе которого объем во флаконе G-REX 100MCS уменьшали на 90%, собранную суспензию клеток переносили в новый флакон G-Rex 500MCS для начала инициации REP на день 11 в среде CM2 с ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) + 5e9 фидерных клеток и ОКТ-3 (30 нг/мл). Клетки размножали и разделяли на день 16 по нескольким флаконам GREX 500 MCS со средой CM4 с ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) согласно протоколу. Затем культуру собирали и криоконсервировали на день 22 согласно протоколу.

[001670] В процессе Gen 3 инициация REP происходила на 7 день, при этом для инициации REP использовали тот же флакон G-REX 100MCS. Вкратце, добавляли в каждый флакон 200-500 мл среды CM2, содержащей ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) и 5×10^8 фидерных клеток с 30 мкг ОКТ-3. На день 9-11 культуру масштабировали. Полный объем G-Rex100MC (1 л) переносили в G-Rex 500MCS и добавляли 4 л CM4, содержащей ИЛ-2 (3000 МЕ/мл). Флаконы инкубировали в течение 5 дней. Культуры собирали и криоконсервировали на 16 день.

[001671] В частности, TIL для дня инициации REP высевали в разные дни, в соответствии с каждым процессом. Для процесса Gen 2, в ходе которого объем во флаконе G-REX 100MCS уменьшали на 90%, собранную суспензию клеток переносили в новый флакон G-Rex 500MCS для начала инициации REP на день 11 в среде CM2 с ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) + 5e9 фидерных клеток и ОКТ-3 (30 нг/мл). Клетки размножали и разделяли на день 16 на несколько флаконов G-Rex 500 MCS со средой CM4, содержащей ИЛ-2 (3000

МЕ/мл), согласно протоколу. Затем культуру собирали и криоконсервировали на день 22 согласно протоколу.

[001672] В частности, высевание для процесса Gen 3 при инициации REP происходила на 7 день, при этом использовали те же G-Rex 100MCS для инициации REP. Вкратце, в каждый флакон добавляли 800 мл среды CM2, содержащей ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) и 1e9 фидерных клеток с 30 мкг OKT-3. На день 11 культуру масштабировали в трех циклах. Полный объем G-Rex100MCS переносили в G-Rex 500MCS и добавляли 4 л CM4, содержащей ИЛ-2 (3000 МЕ/мл). Флаконы инкубировали в течение 5 дней. Культуры собирали и криоконсервировали на 16 день.

[001673] В сравнение были включены три разные опухоли: две опухоли легких (L4054 и L4055) и одна опухоль меланомы (M1085T).

[001674] Среды CM1 (культуральная среда 1), CM2 (культуральная среда 2) и CM4 (культуральная среда 4) готовили заранее и держали при 4°C для L4054 и L4055. Среды CM1 и CM2 готовили без фильтрации для сравнения роста клеток с фильтрацией и без фильтрации среды.

[001675] Среду для опухоли L4055 нагревали при 37°C заранее, до 24 часов до инициации REP и масштабирования.

Обобщенные результаты

[001676] Отличие Gen 3 от Gen 2 по общему количеству жизнеспособных клеток находится в пределах 30% Итоговый продукт Gen 3 демонстрировал большее продуцирование ИФН-γ после рестимуляции. Итоговый продукт Gen 3 демонстрировал повышенное клональное разнообразие, которое измеряли по общему количеству присутствующих уникальных последовательностей CDR3 Итоговый продукт Gen 3 демонстрировал бóльшую среднюю длину теломер.

Достигнутые результаты

Количество клеток и % жизнеспособности:

[001677] Пре-REP и размножение REP в процессах Gen 2 и Gen 3 проводили согласно подробному описанию выше.

[001678] **Таблица 22: Количество клеток до REP (пре-REP).** Два пула для каждой опухоли содержали одинаковое количество фрагментов. Из-за небольшого размера опухолей максимальное количество фрагментов на флакон не было достигнуто. Клетки после пре-REP (TVC) собирали и подсчитывали общее количество клеток на 11 день процесса Gen 2 и на 7 день процесса Gen 3. Для сравнения двух пре-REP групп исследования подсчитанное количество клеток делили на количество фрагментов, помещенных в культуру, для расчета среднего количества жизнеспособных клеток на фрагмент. Как указано в таблице ниже, в процессе Gen 2 стабильно обеспечивал больше клеток на фрагмент по сравнению с процессом Gen 3. Экстраполированное расчетное количество TVC, ожидаемое для процесса Gen 3 на 11 день, рассчитанное путем деления количества TVC до REP на 7 с последующим умножением на 11.

Таблица 22: количество клеток до REP (пре-REP)

ID опухоли	L4054		L4055*		M1085T	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
пре-REP TVC	1,42E+08	4,32E+07	2.,68E+07	1,38E+07	1,23E+07	3,50E+06
Количество фрагментов	21	21	24	24	16	16
Среднее количество TVC на фрагмент при сборе до REP	6,78E+06	2,06E+06	1,12E+06	5,75E+05	7,66E+05	2,18E+05

*** L4055, нефильтрованная среда.**

[001679] **Таблица 23: Общее количество жизнеспособных клеток и кратность размножения в итоговом продукте TIL:** Для процессов Gen 2 и Gen 3 подсчитывали TVC для каждого условия процесса и определяли процент жизнеспособных клеток для каждого дня процесса. При сборе на 22 (Gen 2) и 16 (Gen 3) день собирали клетки и определяли количество TVC. Затем количество TVC делили на количество фрагментов, использованных на день 0, чтобы вычислить среднее количество жизнеспособных клеток на каждый фрагмент. Кратность размножения рассчитывали путем деления количества TVC при сборе на количество TVC при инициации REP. Как показано в таблице сравнения Gen 2 и Gen 3, кратность размножения была аналогична для L4054; в случае L4055 кратность размножения была выше для процесса Gen 2. В частности, в этом случае среду подогревали за 24 часа до дня инициации REP. Более высокая кратность размножения также наблюдалась в Gen 3 для M1085T. Экстраполированное расчетное количество TVC, ожидаемое для процесса Gen 3 на 22 день, рассчитанное путем деления количества REP TVC на 16, а затем умножения на 22.

Таблица 23: Общее количество жизнеспособных клеток и кратность размножения в итоговом продукте TIL

ID опухоли	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Количество фрагментов	**21**	**21**	**24**	**24**	**16**	**16**
TVC при инициации REP	1,42E+08	4,32E+07	2,68E+07	1,38E+07	1,23E+07	3,50E+06

TVC при масштабировании (в том числе фидерные клетки)	3,36E+09	9,35E+08	3,49E+09	8,44E+08	1,99E+09	3,25E+08
TVC при сборе	6,67E+10	1,84E+10	5,52E+10	8,76E+09	1,13E+10	7,68E+09
Кратность размножения Сбор после REP/ Инициация REP	**468,4**	**425,9**	**2056,8**	**634,6**	**925,0**	**2197,2**
TVC /фрагмент (при сборе после REP)	3,18E+09	8,77E+08	2,30E+09	3,65E+08	7,09E+08	4,80E+08

*** L4055, нефильтрованная среда.**

[001680] **Таблица 24: %Жизнеспособности итогового продукта TIL:** После сбора % жизнеспособности итоговых продуктов REP TIL сравнивали с критериями для выпуска. При любых условиях процессы Gen 2 и Gen 3 превосходили критерий 70% жизнеспособности и результаты были сопоставимы для разных процессов и разных опухолей.

Таблица 24: % Жизнеспособности при REP

ID опухоли	**L4054**		**L4055***		**M1085T**	
Процесс	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Инициация REP	98,23%	97,97%	97,43%	92,03%	81,85%	68,27%
Масштабирование	94,00%	93,57%	90,50%	95,93%	78,55%	71,15%
Сбор	87,95%	89,85%	87,50%	86,70%	86,10%	87,45%

*** L4055, нефильтрованная среда.**

[001681] **Таблица 25: Расчетное количество клеток на дополнительный флакон для процесса Gen 3**. Из-за того, что количество фрагментов на флакон ниже максимально необходимого, для каждой опухоли определяли расчетное количество клеток в день сбора. Расчет количества была основан на допущении, что размер клинических опухолей достаточно значителен для засевания 2 или 3 флаконов на 0 день.

Таблица 25: Экстраполированное расчетное количество клеток для полного масштаба 2 и 3 флакона в процессе Gen 3

ID опухоли	**L4054**		**L4055**		**M1085T**	
Процесс Gen 3	**2 флакона**	**3 флакона**	**2 флакона**	**3 флакона**	**2 флакона**	**3 флакона**

Расчетное количество при сборе	3,68E+10	5,52E+10	1,75E+10	2,63E+10	1,54E+10	2,30E+10

ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЕ:

Сравнение фенотипических маркеров в итоговом продукте TIL:

[001682] В трех опухолях L4054, L4055 и M1085T проводили размножение TIL в обоих процессах, Gen 2 и Gen 3. После сбора итоговые продукты REP TIL подвергали проточно-цитометрическому анализу для тестирования чистоты, дифференцировки и определения маркеров клеток памяти. Для всех условий процент клеток TCR a/b+ составлял более 90%.

[001683] TIL, собранные в процессе Gen 3, демонстрировали более высокую экспрессию CD8 и CD28 по сравнению с TIL, собранными в процессе Gen 2. Для процесса Gen 2 наблюдался более высокий процент CD4+. **См. фиг. 3 (A, B, C)**.

Сравнение маркеров клеток памяти в итоговом продукте TIL:

[001684] TIL, собранные в процессе Gen 3, демонстрировали более высокую экспрессию для компартментов центральной памяти по сравнению с TIL из процесса Gen 2. **См. фиг. 4 (A, B, C)**.

Сравнение маркеров активации и истощения в итоговом продукте TIL:

[001685] Маркеры активации и истощения анализировали в TIL из двух опухолей L4054 и L4055 для сравнения итогового продукта TIL из процессов размножения TIL Gen 2 и Gen 3. Маркеры активации и истощения были сопоставимы для процессов Gen 2 и Gen 3**. См. фиг. 5 (A, B); фиг. 6 (A, B).**

СЕКРЕЦИЯ ИНТЕРФЕРОНА ГАММА ПОСЛЕ РЕСТИМУЛЯЦИИ:

[001686] В день сбора, день 22 для Gen 2 и день 16 для Gen 3, TIL рестимулировали в течение ночи на покрытых антителом к CD3 планшетах для L4054 и L4055. Рестимуляцию M1085T проводили с применением гранул, покрытых антителом к CD3, CD28 и CD137. Супернатант собирали через 24 часа рестимуляции в любых условиях и замораживали. Анализ ИФНγ с применением ИФА ELISA проводили на супернатанте из обоих процессов одновременно с применением одного планшета для ELISA. Большее продуцирование ИФНγ для процесса Gen 3 наблюдалось в трех проанализированных опухолях. **См. фиг. 7 (A, B, C).**

ИЗМЕРЕНИЕ УРОВНЕЙ ИЛ-2 В КУЛЬТУРАЛЬНОЙ СРЕДЕ:

[001687] Для сравнения потребления ИЛ-2 в процессах Gen 2 и Gen 3 клеточные супернатанты собирали в дни инициации REP, масштабирования и сбора для опухолей L4054 и L4055. Количество ИЛ-2 в супернатанте культур клеток измеряли с помощью набора для количественного анализа ELISA от R&D. Общий тренд показывает, что концентрация ИЛ-2 остается более высокой в процессах Gen 3 по сравнению с процессами Gen 2. Это, вероятно, связано с более высокой концентрацией ИЛ-2 в момент инициации REP (6000 МЕ/мл) для Gen 3 в сочетании с сохранением переносимой среды на

протяжении всего процесса. **См. фиг. 8 (A, B).**

АНАЛИЗ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СУБСТРАТА И МЕТАБОЛИТОВ

[001688] Уровни метаболических субстратов, таких как D-глюкоза и L-глутамин, измеряли в качестве суррогатов для оценки общего потребления среды. Измеряли их эквивалентные метаболиты, такие как молочная кислота и аммиак. Глюкоза представляет собой простой сахар в среде, который используется митохондриями для производства энергии в форме АТФ. При окислении глюкозы образуется молочная кислота (лактат представляет собой сложный эфир молочной кислоты). Лактат интенсивно продуцируется в фазе экспоненциального роста клеток. Высокие уровни лактата отрицательно влияют на процессы в культурах клеток. **См. фиг. 9 (A, B).**

[001689] Отработанную среду для L4054 и L4055 собирали в дни инициации REP, масштабирования и сбора для обоих процессов, Gen 2 и Gen 3. Отработанную среду собирали на 11 день, 16 день и 22 день Gen 2; и на 7 день, 11 день и 16 день Gen 3. Супернатант анализировали на CEDEX Bio Analyzer на концентрацию глюкозы, молочной кислоты, глутамина, Glutamax и аммиака.

[001690] L-глутамин представляет собой нестабильную незаменимую аминокислоту, необходимый компонент сред для культивирования клеток. Глутамин содержит амин, а эта амидная структурная группа способна транспортировать и доставлять азот в клетки. Когда L-глутамин окисляется, клетка продуцирует токсичный побочный продукт аммиак. Для противодействия разрушению L-глутамина в среду для процессов Gen 2 и Gen 3 добавляли Glutamax, который более стабилен в водных растворах и не разлагается самопроизвольно. В двух опухолевых линиях в группе Gen 3 (16-дневный процесс) наблюдалось снижение уровней L-глутамина и Glutamax в ходе процесса и повышение уровня аммиака на всем протяжении REP. В группе Gen 2 (22-дневный процесс) наблюдалась постоянная концентрация L-глутамина и Glutamax и небольшое повышение продуцирования аммиака. Процессы Gen 2 и Gen 3 были сопоставимы в день сбора (22 для Gen 2; 16 для Gen 3) в отношении уровней аммиака и продемонстрировали незначительные различия в отношении разрушения L-глутамина. **См. фиг. 10 (A, B, C).**

АНАЛИЗ ТЕЛОМЕРНЫХ ПОВТОРОВ МЕТОДОМ FLOW - FISH:

[001691] Технологию Flow-FISH использовали для измерения средней длины теломерного повтора для L4054 и L4055 в рамках процессов Gen 2 и Gen 3. Относительную длину теломер (RTL) определяли с применением набора Telomere PNA /FITC для проточно-цитометрического анализа от DAKO. Для Gen 3 и Gen 2 наблюдалась сопоставимая длина теломер.

Анализ CD3

[001692] Для определения клонального разнообразия клеточных продуктов, полученных с помощью каждого процесса, брали пробы конечного продукта TIL, собранного из L4054 и L4055, и анализировали клональное разнообразие путем секвенирования CDR3-части Т-клеточных рецепторов.

[001693] Таблица 26: Сравнение процентного содержания общих уникальных

последовательностей CDR3 на L4054 в собранном клеточном продукте TIL для Gen 2 и Gen 3. 199 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3 и Gen 2, что соответствует 97,07% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 итогового продукта Gen 2, общих с Gen 3.

Таблица 26: Сравнение общих последовательностей uCDR3 в процессах Gen 2 и Gen 3 для L4054.

Количество uCDR3 (% перекрывания)	**Все uCDR3**		**Лидирующие 80% uCDR3**	
	Gen 2	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Gen 2-L4054	8915	4355 **(48,85%)**	205	199 **(97,07%)**
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

[001694] **Таблица 27: Сравнение процента общих уникальных последовательностей CDR3 на L4055 в собранном клеточном продукте TIL для Gen 2 и Gen3.** 1833 последовательности являются общими для итоговых продуктов Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для итогового продукта Gen 2, общих с итоговым продуктом Gen 3.

Таблица 27: Сравнение общих последовательностей uCDR3 в процессах Gen 2 и Gen 3 на L4055.

Количество uCDR3 (% перекрывания)	**Все uCDR3**		**Лидирующие 80% uCDR3's**	
	Gen 2	**Gen 3**	**Gen 2**	**Gen 3**
Gen 2-L4055	12996	6599 **(50,77%)**	1843	1833 **(99,45%)**
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

[001695] Среды CM1 и CM2 готовили заранее без фильтрации и держали при 4°C до использования для опухоли L4055 в процессах Gen 2 и Gen 3.

[001696] Среду заранее нагревали до 37°C в течение 24 часов для опухоли L4055 в день инициации REP для процессов Gen 2 и Gen 3.

[001697] ЛДГ в собранных в процессах супернатантах не измеряли.

[001698] Подсчет клеток TIL M1085T выполняли с помощью счетчика клеток Cellometer K2.

[001699] Для опухоли M1085T отсутствовали такие образцы, как супернатант для метаболического анализа, продукт TIL для анализа маркеров активации и истощения, анализа длины теломер и CD3 - TCR vb.

ВЫВОДЫ

[001700] В указанном примере сравнивают опухолевую ткань от 3 независимых доноров применительно к функциональным качественным характеристикам, а также расширенные фенотипические характеристики и потребление среды в рамках процессов Gen 2 и Gen 3.

[001701] Размножение пре-REP и REP в Gen 2 и Gen 3 сравнивали в отношении общего количества полученных жизнеспособных клеток и жизнеспособности всей

популяции ядросодержащих клеток. Дозы клеток TVC в день сбора для Gen 2 (22 дня) и Gen 3 (16 дней) не были сопоставимыми. Дозы клеток в Gen 3 были ниже, чем в Gen 2, и составляли около 40% от общего числа жизнеспособных клеток, полученных при сборе.

[001702] Экстраполированное количество клеток вычисляли для процесса Gen 3 с допущением, что сбор до REP (пре-REP) происходит на 11 день вместо 7 дня, а сбор после REP происходит на 22 день вместо 16 дня. В обоих случаях наблюдались более близкие количества TVC при использовании процесса Gen 3 по сравнению с процессом Gen 2, что свидетельствует о том, что ранняя активация позволяет улучшить общую производительность при культивировании TIL. См. таблицы 4 и 5, нижняя строка.

[001703] В случае экстраполированного значения для дополнительных флаконов (2 или 3) в процессе Gen 3 предполагается больший размер обрабатываемой опухоли и достижение максимального количества фрагментов, необходимых для каждого процесса согласно описанию. Было отмечено, что аналогичная доза может быть достигнута для TVC на 16 день (сбор) процесса Gen 3 и на 22 день для процесса Gen 2. Это наблюдение имеет важное значение и указывает на то, что ранняя активация культуры может обеспечить лучшую производительность TIL за меньшее время обработки.

[001704] Размножения пре-REP и REP в процессах Gen 2 и Gen 3 сравнивали применительно к общему количеству полученных жизнеспособных клеток и жизнеспособности всей популяции ядросодержащих клеток. Дозы клеток TVC в день сбора Gen 2 (22 дня) и Gen 3 (16 дней) не были сопоставимыми. Дозы клеток в Gen 3 были ниже, чем в Gen 2, и составляли около 40% от общего числа жизнеспособных клеток, полученных при сборе.

[001705] Что касается фенотипических характеристик, более высокая экспрессия CD8+ и CD28+ наблюдалась на трех опухолях в процессе Gen 3 по сравнению с процессом Gen 2. Эти данные указывают на улучшенные признаки итогового продукта TIL при применении процесса Gen 3 по сравнению с Gen 2.

[001706] Для процесса Gen 3 наблюдалась несколько более высокая экспрессия компартментов центральной памяти по сравнению с процессом Gen 2.

[001707] Процессы Gen 2 и Gen 3 продемонстрировали сопоставимые уровни маркеров активации и истощения, несмотря на меньшую продолжительность процесса Gen 3.

[001708] Продуцирование ИФН-гамма (ИФНγ) было в 3 раза выше в итоговом продукте Gen 3 по сравнению с продуктом Gen 2 для трех проанализированных опухолей. Эти данные показывают, что процесс Gen 3 обеспечивал получение высокофункционального и более активного продукта TIL по сравнению с процессом Gen 2, возможно, из-за более высокой экспрессии CD8 и экспрессии CD28 при Gen 3. В итоговом продукте Gen 3 продуцировалось в три раза больше ИФН-γ по сравнению с Gen 2 в трех проанализированных опухолях, что предполагает, что процесс Gen 3 обеспечивал получение высокофункциональных TIL. Фенотипические характеристики предполагают положительные тренды в отношении экспрессии CD8+, CD28+ на трех опухолях при Gen

3 по сравнению с процессом Gen 2.

[001709] Длина теломер в конечном продукте TIL для Gen 2 и Gen 3 была сопоставимой.

[001710] Уровни глюкозы и лактата были сопоставимыми в конечных продуктах Gen 2 и Gen 3, что предполагает, что на уровни питательных веществ в средах при процессе Gen 3 не влияли невыполнение ежедневного восполнения снижения объема в ходе процесса и меньший объем среды в целом по сравнению с Gen 2.

[001711] В целом в процессе Gen 3 наблюдалось сокращение продолжительности обработки почти в два раза по сравнению с процессом Gen 2, которое могло бы существенно снизить себестоимость (COG) продукта TIL при размножении с помощью процесса Gen 3.

[001712] Уровни потребления ИЛ-2 указывают на общий тренд потребления ИЛ-2 в процессе Gen 2; в процессе Gen 3 уровни ИЛ-2 были выше из-за того, что старую среду не удаляли.

[001713] Для процесса Gen 3 наблюдалось более высокое клональное разнообразие, измеренное с помощью анализа последовательностей CDR3 TCRab.

[001714] Добавление фидерных клеток и OKT-3 на 0 день пре-REP обеспечивало раннюю активацию TIL и лучшую производительность в целом при росте TIL при использовании процесса Gen 3.

[001715] В таблице 28 представлено сравнение различных вариантов реализации и результатов процесса Gen 3 и существующего процесса Gen 2:

Таблица 28: Пример процесса Gen 3.

Этап	**Процесс Gen 2**	**Процесс Gen 3 - Оптимизированный**
Пре-REP- день 0	≤50 фрагментов 1X G-Rex 100MCS 1 л среды ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) 11 дней	≤240 фрагментов ≤60 фрагментов/флакон ≤4 флаконов ≤2 л среды (500 мл/флакон) ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) $2,5 \times 10^8$ фидерных клеток /флакон 15 мкг OKT3/флакон
Инициация REP	Введение свежих TIL непосредственно в REP День 11 $\leq 200e^6$ жизнеспособных	Введение свежих TIL непосредственно в REP День 7 Активация всей культуры

	клеток 5×10^9 фидерных клеток G-Rex 500MCS 5 л среды CM2+ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) 150 мкг OKT3	5×10^8 фидерных клеток 30 мкг OKT3/флакон G-Rex 100MCS 500 мл среды+ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
Субкультивирование TIL или Масштабирование	≤5 G-REX 500MCS ≤1 × 10 жизнеспособных клеток/ флакон 5 л/флакон День 16	≤4 G-REX 500MCS Масштабирование всей культуры 4 л/флакон День 10-11
Сбор	Сбор, день 22, LOVO - устройство для автоматизированного промывания клеток 2 цикла промывания	Сбор, день 16 LOVO - устройство для автоматизированного промывания клеток 5 цикла промывания
Получение итогового состава	Криоконсервированный Продукт 300МЕ/мл ИЛ2- CS10 в LN_2, несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ-2-CS10 в LN_2, несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дней**	**16 дней**

ПРИМЕР 6: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ ОТБОРА И РАЗМНОЖЕНИЯ ЛПК ИЗ МКПК У ПАЦИЕНТОВ С ХЛЛ.

[001716] МКПК собирают у пациентов и либо замораживают для последующего использования, либо используют свежими. Собирают достаточный объем периферической крови, чтобы получить по меньшей мере около 400 млн (400×10^6) МКПК для исходного материала для способа согласно настоящему изобретению. На 0 день осуществления указанного способа либо готовят свежий раствор, либо размораживают ИЛ-2 в концентрации 6×10^6 МЕ/мл, и хранят при 4°C или на льду до использования. Готовят 200 мл среды CM2, смешивая 100 мл среды CM1 (содержащей GlutaMAX®) с последующим разведением ее 100 мл (1: 1) AIM-V с получением CM2. Среду CM2 защищают от воздействия света и держат в плотно закрытой таре, когда она не используется.

[001717] Все последующие этапы проводят в условиях стерильного культивирования клеток. Аликвоту CM2 нагревают в конической пробирке объемом 50 мл

на водяной бане при 37°C для использования при размораживании и/или промывании замороженного образца МКПК. При использовании замороженного образца МКПК образец вынимают из морозильной камеры и хранят на сухом льду, пока он не будет готов к размораживанию. Когда криофлакон с МКПК готов к размораживанию, 5 мл среды CM2 помещают в стерильную коническую пробирку на 50 мл. Криофлакон с образцом МКПК помещают в водяную баню при 37°C до тех пор, пока не останется только несколько кристаллов льда. Нагретую среду CM2 по каплям добавляют во флакон с образцом в объемном соотношении образец: среда 1: 1 (приблизительно 1 мл). Все содержимое полностью извлекают из криофлакона и переносят в оставшуюся среду CM2 в конической пробирке на 50 мл. Дополнительные 1-2 мл среды CM2 используют для промывания криофлакона, и все содержимое криофлакона извлекают и переносят в коническую пробирку на 50 мл. Затем объем в конической пробирке доводят добавлением дополнительной среды CM2 до 15 мл и осторожно перемешивают, чтобы промыть клетки. Затем коническую пробирку центрифугируют при 400 g в течение 5 минут при комнатной температуре, чтобы собрать клеточный осадок.

[001718] Супернатант отделяют от осадка, коническую пробирку закрывают, а затем клеточный осадок разбивают, например, проводя пробиркой по шероховатой поверхности. К осадку клеток добавляют около 1 мл среды CM2, осадок и среду аспирируют в направлении вверх и вниз 5-10 раз с помощью пипетки, чтобы разъединить клеточный осадок. В пробирку добавляют еще 3-5 мл среды CM2 и перемешивают с помощью пипетки для суспендирования клеток. В этот момент регистрируют объем суспензии клеток. Извлекают из пробирки 100 мкл суспензии клеток для подсчета клеток с помощью автоматического счетчика клеток, например, Nexcelom Cellometer K2. Определяют и регистрируют количество живых клеток в образце.

[001719] Резервируют минимум 5×10^6 клеток для фенотипирования и других экспериментов для определения характеристик. Центрифугируют зарезервированные клетки при 400 g в течение 5 минут при комнатной температуре, чтобы собрать клеточный осадок. Ресуспендируют клеточный осадок в среде для замораживания (стерильная инактивированная нагреванием ФБС, содержащая 20% ДМСО). Замораживают одну или две аликвоты зарезервированных клеток среде для замораживания и медленно замораживают аликвоты в морозильной камере для клеток (Mr. Frosty™) в морозильнике с температурой -80 °C. Переносят для хранения в жидкий азот минимум через 24 часа при -80 °C.

[001720] Для следующих этапов используют предварительно охлажденные растворы, работают быстро и держат клетки в холоде. Следующим шагом является очистка фракции Т-клеток в образце МКПК. Его проводят с помощью набора для выделения Т-клеток Pan T-cell Isolation Kit (Miltenyi, каталог № 130-096-535). Подготавливают клетки к очищению, промывая стерилизованным фильтрацией промывочным буфером, содержащим ФСБ, 0,5% БСА и 2 мМ EDTA при pH 7,2. Образец МКПК центрифугируют при 400 g в течение 5 минут для сбора клеточного осадка.

Супернатант удаляют аспирацией, а осадок клеток ресуспендируют в 40 мкл промывочного буфера на каждые 10^7 клеток. Добавляют 10 мкл универсального коктейля биотин/антитело для Т-клеток на каждые 107 клеток. Тщательно перемешивают и инкубируют 5 минут в холодильнике или на льду. Добавляют 30 мкл 30 мкл промывочного буфера на каждые 10^7 клеток. Добавляют 20 мкл коктейля Pan T-cell MicroBead Cocktail на каждые 10^7 клеток. Тщательно перемешивают и инкубируют в течение 10 минут в холодильнике или на льду. Готовят LS колонку и отделяют клетки от микрогранул с помощью магнита. LS Колонку помещают в магнитное поле QuadroMACS. LS колонку промывают 3 мл холодного промывочного буфера, жидкость собирают и утилизируют. Суспензию клеток вносят в колонку и собирают проточную фракцию с клетками (немеченые клетки). Указанная проточная фракция представляет собой обогащенную Т-клетками фракцию (ЛПК) Промывают колонку 3 мл промывочного буфера и собирают проточную фракцию в ту же пробирку, что и первую проточную фракцию. Закрывают пробирку крышкой и кладут на лед. Указанная фракция представляет собой фракцию Т-клеток, или ЛПК. LS колонку убирают из магнитного поля, промывают 5 мл промывочного буфера и собирают фракцию не-Т-клеток (клетки с магнитной меткой) в другую пробирку. Центрифугируют обе фракции при 400 g в течение 5 минут, чтобы собрать клеточный осадок. Супернатанты аспирируют из обоих образцов, разбивают осадок, ресуспендируют клетки в 1 мл среды CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 для каждого осадка и пипетируют раствор вверх и вниз 5-10 раз, чтобы разъединить осадок. Добавляют 1-2 мл CM2 к каждому образцу, тщательно перемешивают каждый образец и помещают для хранения в инкубатор для культур тканей для следующих этапов. Извлекают аликвоту объемом около 50 мкл из каждого образца, подсчитывают клетки и регистрируют количество и жизнеспособность.

[001721] Затем Т-клетки (ЛПК) культивируют с гранулами Dynabeads™ Human T-Expander CD3/CD28. Сосуд со стоковым раствором Dynabeads перемешивают на вортексе в течение 30 секунд со средней скоростью. Требуемую аликвоту гранул извлекают из сосуда со стоковым раствором в стерильную микропробирку объемом 1,5 мл. Гранулы промывают раствором для промывания гранул, добавляя 1 мл раствора для промывания гранул в микропробирку объемом 1,5 мл, содержащую гранулы. Осторожно перемешивают. Помещают пробирку на магнит DynaMag™ -2 и оставляют на 30 минут, чтобы притянуть гранулы к магниту. Удаляют промывочный раствор с гранул аспирацией и снимают пробирку с магнита. К гранулам добавляют 1 мл среды CM2 с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Все содержимое микропробирки переносят в коническую пробирку на 15 или 50 мл. Доводят концентрацию гранул до конечной концентрации около 500 000/мл, используя среду CM2 с ИЛ-2.

[001722] Т-клетки (ЛПК) и гранулы культивируют совместно следующим образом. На 0 день: в 24-луночный планшет G-Rex, в общей сложности 7 мл на лунку добавляют 500000 Т-клеток, 500000 CD3/CD28 Dynabeads и CM2 с ИЛ-2. Планшет G-Rex помещают в увлажненный инкубатор с температурой 37°C и 5% CO^2 до следующего этапа процесса

(на 4 день). Остальные клетки замораживают в среде для криоконсервации CS10 с применением морозильной камеры для клеток Mr. Frosty™. Фракцию клеток, не относящуюся к Т-клеткам, замораживают в среде для криоконсервации CS10 с использованием морозильной камеры для клеток Mr. Frosty. На 4 день среду заменяют. Половину среды (около 3,5 мл) удаляют из каждой лунки планшета G-rex. Достаточный объем (около 3,5 мл) среды CM4 с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретой до 37 °С, добавляют для замены среды, удаленной из каждой лунки с образцом. Планшет G-rex возвращают в инкубатор.

[001723] На 7 день клетки подготавливают к размножению в протоколе REP. Планшет G-rex вынимают из инкубатора, половину среды удаляют из каждой лунки и утилизируют. Клетки ресуспендируют в оставшейся среде и переносят в коническую пробирку на 15 мл. Лунки промывают 1 мл CM4 с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретой до 37 °С, и среду переносят в ту же пробирку на 15 мл с клетками. Репрезентативный образец клеток извлекают и подсчитывают клетки с помощью автоматического счетчика клеток. Если количество живых клеток меньше 1×10^6, процесс размножения на Dynabead в 0 день повторяют. Остальные клетки замораживают для резервного размножения или для фенотипирования и исследований других характеристик. При наличии 1×10^6 живых клеток или более, начинают размножение REP с повторностями в соответствии с протоколом, начиная с 0 дня. Как вариант, при достаточном количестве клеток размножение может быть начато в культуральном флаконе G-rex 10M, с $10\text{-}15 \times 10^6$ ЛПК на флакон и соотношением Dynabeads: ЛПК 1: 1 в конечном объеме 100 мл среды CM4 на лунку с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Планшет и/или флакон возвращают в инкубатор. Избыток ЛПК может быть разделен на аликвоты и медленно заморожен в морозильной камере для клеток Mr. Frosty™ в морозильнике при -80 °С, а затем перенесен для хранения в жидкий азот минимум через 24 часа при -80 °С. Указанные ЛПК могут использоваться в качестве резервных образцов для размножения, или для фенотипирования или исследований других характеристик.

[001724] На 11-й день среду заменяют. Половину среды удаляют либо из каждой лунки планшета G-rex, либо из флакона, и заменяют тем же количеством свежей среды CM4 с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2 при 37 °С.

[001725] На 14 день собирают ЛПК. Если используется планшет G-rex, примерно половину среды удаляют из каждой лунки планшета и утилизируют. ЛПК и гранулы суспендируют в оставшейся среде и переносят в стерильную коническую пробирку на 15 мл (Пробирка 1). Лунки промывают 1-2 мл свежей среды AIM-V, нагретой до 37°С, и смытую среду переносят в пробирку 1. Пробирку 1 закрывают и помещают в магнит DynaMag™ -15 на 1 минуту, чтобы гранулы могли притянуться к магниту. Суспензию клеток переносят в новую пробирку на 15 мл (пробирка 2), и гранулы промывают 2 мл свежей AIM-V при 37 °С. Пробирку 1 помещают обратно в магнит еще на 1 минуту, а затем смытую среду переносят в пробирку 2. Если требуется, содержимое лунок можно объединить после этапа последнего промывания. Извлекают репрезентативный образец

клеток, подсчитывают количество клеток, регистрируют количество и жизнеспособность. Пробирки могут располагаться в инкубаторе во время подсчета. В пробирку 2 можно добавить дополнительную среду AIM-V, если плотность клеток кажется слишком высокой. Если используют флакон, объем во флаконе необходимо снизить примерно до 10 мл. Содержимое колбы перемешивают и переносят в коническую пробирку на 15 мл (пробирка A). Колбу промывают 2 мл среды AIM-V, как описано выше, и смытую среду также переносят в пробирку A. Пробирку A закрывают и помещают в магнит DynaMag™ - 15 на 1 минуту, чтобы гранулы притянулись к магниту. Суспензию клеток переносят в новую пробирку на 15 мл (Пробирка B), и гранулы промывают 2 мл свежей AIM-V при 37 °C. Пробирку A помещают обратно в магнит еще на 1 минуту, а затем смытую среду переносят в пробирку B. Если требуется, содержимое лунок можно объединить после этапа последнего промывания. Извлекают репрезентативный образец клеток и подсчитывают клетки, регистрируют количество и жизнеспособность. Пробирки могут располагаться в инкубаторе во время подсчета. В пробирку B можно добавить дополнительную среду AIM-V, если плотность клеток кажется слишком высокой. Клетки могут быть использованы свежими или заморожены в среде для консервации CS10 в нужных концентрациях.

ПРИМЕР 7: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ РАЗМНОЖЕНИЯ Т-КЛЕТОК ИЗ ГЕМАТОПОЭТИЧЕСКОГО ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ GEN 3.

[001726] На 0 день фракцию Т-клеток (CD3+,CD45+) выделяют из продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, цельной крови или продуктов расщепления опухоли (свежих или размороженных) с применением способов положительного или отрицательного отбора, то есть извлечения Т-клеток с использованием Т-клеточного маркера (CD2,CD3 и т.п.) или извлечения других клеток с сохранением Т-клеток), или градиентного центрифугирования.

[001727] Процесс Gen 3.1 начинают, высевая ~1×10^7 клеток/флакон в соответствии с описанием процесса Gen3 в настоящем документе.

[001728] На 7-й день клетки реактивируют в соответствии с процессом Gen 3.1.

[001729] На 9-11 день клетки масштабируют в соответствии с процессом Gen 3.1.

[001730] На 14-16 день клетки собирают в соответствии с процессом Gen 3.1.

[001731] На фиг. 42 представлена схематическая диаграмма примера варианта реализации размножения TIL из гематопоэтических злокачественных новообразований с использованием процесса Gen 3.

ПРИМЕР 8: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ GEN 3, ДЕНЬ 0

[001732] Готовили среду для промывания опухоли. Нагревали среду до начала процесса. Добавляли 5 мл гентамицина (50мг/мл) в 500 мл сосуд с HBSS. Добавляли 5 мл среды для промывания опухолей в коническую пробирку на 15 мл для использования для разведения OKT3. Хранили при комнатной температуре (RT)

[001733] Подготавливали пакеты с фидерными клетками. Стерильным образом переносили фидерные клетки в пакеты для фидерных клеток и хранили при 37°C до использования или замораживания. Подсчитывали фидерные клетки при температуре 37 °C. Размораживали, а затем подсчитывали фидерные клетки, если они были заморожены.

[001734] Оптимальный диапазон концентрации фидерных клеток составляет от 5×10^4 до 5×10^6 клеток/мл. Подготавливали четыре конические пробирки с 4,5 мл AIM-V. Добавляли по 0,5 мл фракции клеток для каждого подсчета клеток.

[001735] Если общее количество жизнеспособных фидерных клеток составляло $\geq 1\times10^9$ клеток, переходили к следующему этапу для корректировки концентрации фидерных клеток. Рассчитывали объем фидерных клеток, который нужно было извлечь из первого пакета фидерных клеток, чтобы добавить 1×10^9 клеток во второй пакет фидерных клеток.

[001736] С помощью микропипетки P1000 переносили 900 мкл среды для промывания опухолей в аликвоту OKT3 (100 мкл). Используя шприц и технику стерильной работы, набирали 0,6 мл OKT3 и добавляли во второй пакет фидерных клеток. Доводили объем среды до общего объема 2 л. Переносили в инкубатор второй пакет фидерных клеток.

[001737] Приготовление OKT3: OKT3 может быть разделен на аликвоты и заморожен в исходной стоковой концентрации из флакона (1 мг/мл) в аликвотах по 100 мкл. ~ 10x аликвот на флакон 1 мл. Хранили при -80C. День 0: 15 мкг/флакон, т.е. 30 нг/мл в 500 мл - макс. 60 мкл ~ 1 аликвота.

[001738] Готовили образцы опухоли. Получали 6-луночный планшет и чашки Петри размером 100 мм (всего 4). Маркировали 6-луночный планшет как «Неиспользованные фрагменты опухоли». Маркировали каждую из четырех чашек Петри диаметром 100 мм как «Промывание_01», «Промывание_02», «Промывание_03», «Промывание_04» и «Для хранения».

[001739] Добавляли 5 мл среды для промывания опухолей во все лунки 6-луночного планшета, маркированного как «Неиспользованные фрагменты опухоли». Сохраняли среду для промывания опухоли в доступе для дальнейшего использования для поддержания влажности опухоли при диссекции.

[001740] Добавляли по 50 мл среды для промывания опухолей во все чашки Петри диаметром 100 мм, помеченную как «Промывание_01», «Промывание_02», «Промывание_03», «Для хранения» («Промывание_04»). С помощью маркера маркировали каждую чашку Петри: от «Диссекция 1» до «Диссекция 4». Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке «Промывание_01»в течение $\geq$ 3 мин. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке «Промывание_02», в течение $\geq$ 3 мин. Инкубировали опухоль при температуре окружающей среды в чашке «Промывание_03» в течение $\geq$ 3 мин. Чашка «Промывание_04» предназначен для хранения опухоли после трех промываний. После завершения промывания опухоль перемещали в чашку «Для хранения», чтобы ткань

оставалась увлажненной.

[001741] Пока происходила инкубация опухолей переносили 10 мл среды для транспортировки опухоли в пробирку, маркированную как «Среда для транспортировки опухолей». Набирали по 10 мл среды для транспортировки опухолей в шприц и инокулировали каждый стерильный сосуд для анаэробной и аэробной культуры 5 мл среды для транспортировки опухолей.

[001742] Помещали линейку под крышку чашки Петри и оставляли до окончания процесса диссекции. Измеряли и записывали длину опухоли и количество фрагментов. Опухоль рассекали на четыре промежуточных фрагмента или группировали в четыре группы эквивалентного объема, сохраняя структуру опухоли в каждом промежуточном фрагменте. Фрагменты опухоли поддерживали в увлажненном состоянии.

[001743] Любые промежуточные фрагменты опухоли, которые не подвергались активной диссекции, перемещали в чашку «для хранения», чтобы ткань оставалась увлажненной.

[001744] Опухоль рассекали на фрагменты размером 27 мм^3 (3×3x3 мм), используя линейку под крышкой чашки для диссекции в качестве ориентира. Промежуточный фрагмент рассекали до получения 60 фрагментов. Подсчитывали общее количество итоговых фрагментов и подготавливали флаконы G-Rex 100MCS в соответствии с количеством полученных итоговых фрагментов (как правило, по 60 фрагментов на флакон).

[001745] Сохраняли подходящие фрагменты ткани в конических пробирках, маркированных как «Пробирка с фрагментами 1» - «Пробирка с фрагментами 4». Рассчитывали количество флаконов G-Rex 100MCS для посева суспензии фидерных клеток в соответствии с количеством полученных пробирок с фрагментами.

[001746] Вынимали пакет с фидерными клетками из инкубатора и засевали G-Rex 100MCS. Маркировали «D0» (день 0).

КУЛЬТУРА ДОБАВЛЕННЫХ ФРАГМЕНТОВ ОПУХОЛИ В G-REX100MCS

[001747] В стерильных условиях развинчивали крышку G-Rex 100MCS, маркированного как «Культура фрагментов опухоли (D0) 1» и конической пробирки на 50 мл, маркированной «Пробирка с фрагментами». Вращали открытую «пробирку с фрагментами 1», одновременно приподнимая крышку G-Rex100MCS. Добавляли среду с фрагментами в G-Rex100MCS при перемешивании. Регистрировали количество фрагментов, перенесенных в G-Rex100MCS.

[001748] После размещения фрагментов на дне флакона GREX набирали 7 мл среды и создавали семь аликвот по 1 мл: 5 мл для определения расширенных характеристик и 2 мл в качестве образцов для анализа стерильности. 5 аликвот для определения расширенных характеристик (супернатант итоговой культуры фрагментов) помещали на хранение при -20°C до использования

[001749] Инокулировали один анаэробный флакон BacT/Alert и один аэробный флакон BacT/Alert 1 мл супернатанта итоговой культуры фрагментов. Повторяли для

каждого флакона, из которого брали образцы.

ПРИМЕР 9: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ GEN 3 НА 7-8 ДНИ

[001750] Подготавливали пакеты с фидерными клетками. Замороженные пакеты с фидерными клетками размораживали в течение 3-5 минут на водяной бане при 37 °C. Подсчитывали фидерные клетки, если она были заморожены.

[001751] Оптимальный диапазон концентраций фидерных клеток составляет от 5×10^4 до 5×10^6 клеток/мл. Подготавливали четыре конических пробирки с 4,5 мл AIM-V. В новую криопробирку добавляли по 0,5 мл клеточной фракции для каждого подсчета клеток. Хорошо перемешивали образцы и приступили к подсчету клеток.

[001752] Если общее количество жизнеспособных фидерных клеток составляло $\geq 2\times10^9$ клеток, переходили к следующему шагу для корректировки концентрации фидерных клеток. Рассчитывали объем фидерных клеток для удаления из первого пакета фидерных клеток, чтобы добавить 2 x 10^9 клеток во второй пакет фидерных клеток.

[001753] Используя микропипетку p1000, переносят 900 мкл HBSS в аликвоту 100 мкл OKT3. Перемешивают пипетированием вверх и вниз, три раза. Готовили две аликвоты.

[001754] Приготовление OKT3: OKT3 может разделено на на аликвоты и заморожено в исходной стоковой концентрации из флакона (1 мг/мл) в аликвотах по 100 мкл. ~ 10X аликвот на 1 мл флакон. Хранение при -80C. День 7/8: 30 мкг/флакон, т.е. 60 нг/мл в 500 мл - максимум 120 мкл ~ 2 аликвоты.

[001755] Используя шприц и технику стерильной работы, набирали 0,6 мл OKT3 и добавляли в пакет с фидерными клетками, следя за тем, чтобы добавить весь раствор полностью. Доводили общий объем среды до 2 л. Повторяли для второй аликвоты OKT3 и добавляли в пакет с фидерными клетками. Переносили в инкубатор второй пакет с фидерными клетками.

ПОДГОТОВКА ФЛАКОНА G-REX100MCS С СУСПЕНЗИЕЙ ФИДЕРНЫХ КЛЕТОК

[001756] Регистрировали количество флаконов G-Rex 100MCS для обработки, соответствующее количеству флаконов G-Rex, полученных на день 0. Вынимали из инкубатора флакон G-Rex и второй пакет с фидерными клетками.

Извлечение супернатанта перед добавлением суспензии фидерных клеток:

[001757] К флакону G-Rex100 присоединяли один шприц объемом 10 мл и набирали 5 мл среды. Отбирали пять аликвот по 1 мл: 5 мл для определения расширенных характеристик, и помещали указанные 5 аликвот для определения расширенных характеристик (супернатант итоговой культуры из фрагментов) на хранение при -20°C до затребования спонсором. Маркировали и повторяли для всех флаконов G-Rex100.

[001758] 5-20 X 1 мл образцов для определения характеристик, в зависимости от количества флаконов:

5 мл=1 флакон

10 мл=2 флакона

15 мл=3 флакона

20 мл =4 флакона

[001759] Продолжали высевать фидерные клетки в G-Rex100 MCS, повторяя для всех флаконов G-Rex100 MCS. Используя способы стерильного переноса, сливали 500 мл из второго пакета с фидерными клетками, контролируя массу (с допущением, что 1 г=1мл) в каждый флакон G-Rex 100MCS, и регистрировали количество. Маркировали как «культуру 7 дня» и повторяли для всех флаконов G-Rex100. Переносили флаконы G-Rex 100MCS в инкубатор.

ПРИМЕР 10: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ GEN 3 НА 10-11 ДЕНЬ

[001760] Вынимали первый флакон G-Rex 100MCS и в стерильных условиях извлекали 7 мл супернатанта предварительной культуры, используя шприц объемом 10 мл. Отбирали семь аликвот по 1 мл - 5 мл для определения расширенных характеристик и 2 мл в качестве образцов для анализа стерильности.

[001761] Аккуратно перемешивали содержимое флакона и с использованием нового шприца на 10 мл извлекали 10 мл супернатанта и переносили в пробирку объемом 15 мл, маркированную «D10/11 Супернатант для теста на микоплазму».

[001762] Аккуратно перемешивали, осторожно вращая флакон, чтобы клетки поднялись в суспензию. Используя новый шприц, извлекали указанный ниже объем в соответствии с количеством флаконов для обработки и добавляли в коническую пробирку 50 мл. Образцы, взятые из каждого флакона, хранили отдельно и не объединяли.

1 флакон=40мл

2 флакона=20мл/флакон

3 флакона=13,3мл/флакон

4 флакона=10мл/флакон

[001763] Маркировали каждую коническую пробирку по схеме: «День 10/11, Образец для QC, Флакон № (номер флакона)». Хранили в инкубаторе до использования согласно разделу 14. Повторить для всех флаконов.

[001764] В общей сложности необходимо собрать 40 мл из всех флаконов, объединить в 50 мл конической пробирке, маркированной «день 10/11, Образец для QC» и поместить на хранение в инкубатор до использования. Проводили подсчет клеток и распределяли клетки.

[001765] Помещали 5 аликвот (супернатанта предварительной культуры) для определения расширенных характеристик на хранение при ≤-20°C до использования. Инокулировали один анаэробный флакон BacT/Alert и один аэробный флакон BacT/Alert 1 мл супернатанта предварительной культуры.

[001766] Продолжали, перенося суспензию клеток в G-Rex 500MCS, и повторяли для всех G-Rex 100MCS. В стерильных условиях переносили содержимое каждого G-Rex 100MCS в G-Rex 500MCS, отслеживая перенос приблизительно 100 мл жидкости за один

раз. Перенос останавливали, когда объем в G-Rex 100MCS снижался до 500 мл (или, в некоторых случаях, приблизительно 100 мл).

[001767] На этапе переноса использовали шприц объемом 10 мл и набирали 10 мл суспензии клеток в шприц из G-Rex 100MCS. Следовали инструкциям в соответствии с количеством культивируемых флаконов. При наличии только 1 флакона: Извлекали в общей сложности 20 мл с использованием двух шприцев. При наличии 2 флаконов: извлекали 10 мл на флакон. При наличии 3 флаконов: извлекали 7 мл на флакон. При наличии 4 флаконов: извлекали 5 мл на флакон. Переносили суспензию клеток в одну общую коническую пробирку объемом 50 мл. Держали в инкубаторе до этапа подсчета клеток и взятия образца для QC. Общее количество клеток, необходимое для QC, составляло ~ 20e6 клеток: подсчет проводили 4 раза в объеме 0,5 мл (сначала подсчитывали неразбавленные клетки).

[001768] Необходимое для анализа количество клеток:

Минимум 10e6 клеток для анализа ИФН-G

1e6 клеток для анализа на микоплазму

5e6 клеток для проточной цитометрии на CD3 +/CD45 +

[001769] Флаконы G-Rex 500MCS переносили в инкубатор.

Готовили образцы для QC

[001770] Необходимо по меньшей мере 15×10^8 клеток Анализы включали: количество и жизнеспособность клеток; микоплазма (1×10^6 клеток/средняя концентрация жизнеспособных клеток;) Проточная цитометрия и фенотипирование (5×10^6 клеток/ средняя концентрация жизнеспособных клеток;) и анализ ИФН-g (**5×10^6 клеток - 1×10^6 клеток**; 8-10×10^6 клеток необходимо для анализа ИФН-γ.

[001771] Рассчитывали объем фракции клеток для криоконсервации при плотности 10×10^6 клеток/мл и количество флаконов для подготовки.

ПРИМЕР 11: ПРИМЕР ВАРИАНТА РЕАЛИЗАЦИИ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ GEN 3, ДЕНЬ 16-17

Подготовка промывочного буфера (1% ЧСА PLASMALYTE A)

[001772] Переносили ЧСА и PLasmalyte в пакет объемом 5 л с получением промывочного буфера для LOVO. В стерильных условиях переносили 25% ЧСА общим объемом 125 мл в пакет объемом 5 л. Хранили при комнатной температуре.

[001773] Извлекали и переносили 10 мл или 40 мл промывочного буфера в пробирку с маркировкой «ИЛ-2 6×10^4 МЕ/мл» (10 мл, если раствор ИЛ-2 был приготовлен заранее, или 40 мл, если готовили свежий раствор ИЛ-2). Если готовили свежий раствор ИЛ-2: перемешивали содержимое пакета с промывочным буфером для LOVO и с помощью шприца подходящего размера извлекали и переносили 40 мл промывочного буфера в пробирку с маркировкой «ИЛ-2 6×10^4 МЕ/мл». Если раствор ИЛ-2 был приготовлен заранее, аликвота ИЛ-2 содержала 6×10^4 МЕ/мл.

[001774] Расчетный объем восстановленного ИЛ-2 для добавления к составу Plasmalyte+ 1% ЧСА: объем восстановленного ИЛ-2 = (Конечная концентрация ИЛ-2 x

Итоговый объем)/ удельная активность ИЛ-2 (на основании стандартного протокола анализа и производства). Конечная концентрация ИЛ-2 составляла 6×10^4 МЕ/мл. Конечный объем составлял 40 мл.

[001775] Извлекали необходимый расчетный начальный объем восстановленного ИЛ-2 и переносили в пробирку с маркировкой «ИЛ-2 6×10^4 МЕ/мл». Добавляли 100 мкл ИЛ-2 6×10^6 МЕ/мл из аликвоты, подготовленной заранее, в пробирку, маркированную «ИЛ-2 6×10^4 МЕ/мл», содержащую 10 мл промывочного буфера для LOVO.

[001776] Извлекали приблизительно 4500 мл супернатанта из флаконов G-Rex 500MCS. Вращением перемешивали оставшийся супернатант и переносили клетки в пакет для сбора клеток. Повторяли для всех флаконов G-Rex 500MCS.

[001777] Извлекали 60 мл супернатанта и добавляли в пробирки для супернатанта для проведения анализов контроля качества, в том числе для детекции микоплазмы. Хранили при +2-8°C.

Сбор клеток

[001778] Подсчет клеток. Подготовить четыре конических колбы объемом 15 мл с 4,5 мл AIM-V. Указанные колбы можно подготовить заранее. Оптимальный диапазон=от 5×10^4 до 5×10^6 клеток/мл. (рекомендовано разведение 1:10). Для разведения 1:10 к заранее приготовленным 4500 мкл AIM V добавляли 500 мкл CF. Регистрировали коэффициент разведения.

[001779] Расчетное количество TC («Total Cells», всего клеток) пре-LOVO (живые+мертвые) =

Средняя общая концентрация
клеток (TC Конц., пре-LOVO)
(живые+мертвые)
X
Объем пакета с исходным материалом (Source Bag)

[001780] Расчетное количество TVC (всего жизнеспособных клеток) пре-LOVO (живые) =

Средняя общая концентрация жизнеспособных
клеток (TVC пре-LOVO)
(живые)
X
Объем пакета LOVO Source Bag

[001781] При общем количестве клеток (TC) > 5×10^9, извлекают 5×10^8 клеток для криоконсервирования в качестве образцов MDA для архивного хранения. 5×10^8 ÷ средн. концентрация TC (этап 14,44) = объем для удаления

[001782] При общем количестве клеток (TC) ≤ 5×10^9, извлекают 4×10^6 для криоконсервирования в качестве образцов MDA для архивного хранения. 4×10^6 ÷ средн. концентрация TC=объем для удаления.

[001783] Использовали шприц подходящего размера, чтобы извлечь необходимый

объем из пакета LOVO Source Bag. Хранят в инкубаторе до этапов криоконсервации.

[001784] После определения общего количества клеток определяют количество клеток для извлечения, после которого должно оставаться 150×10^9 жизнеспособных клеток. Подтверждают объем TVC пре-LOVO 5×10^8, или 4×10^6, или статус «неприменимо». Рассчитывали объем клеток для извлечения.

[001785] Рассчитывали оставшееся общее количество клеток в пакете. Рассчитывали TC (общее количество клеток) пре-LOVO. [Средн. Общая концентрация клеток X оставшийся объем=оставшееся количество TC пре-LOVO]

[001786] С учетом оставшегося общего количества клеток выбирали соответствующий процесс в таблице ниже:

Общее количество клеток:	***Ретентат (мл)***
$0 <$ Общее количество клеток $\leq 31\times10^9$	**115**
$31\times10^9 <$ Общее количество клеток $\leq 71\times10^9$	**165**
$71\times10^9 <$ Общее количество клеток $\leq 110\times10^9$	**215**
$110\times10^9 <$ Общее количество клеток $\leq 115\times10^9$	**265**

[001787] Выбрать объем ИЛ-2 для добавления в используемый процесс. Объем рассчитывают таким образом: Объем ретентата x 2×300 МЕ/мл=требуемое кол-во МЕ ИЛ-2. Требуемое количество МЕ ИЛ-2/6 $x10^4$ МЕ/мл=Объем ИЛ-2 для добавления в пакет Пост-LOVO. Регистрируют все добавленные объемы. Помещают образцы в криофлакон для дальнейшего анализа.

[001788] Хорошо перемешивают клеточный продукт. Герметизируют все пакеты для дальнейшей обработки, включая криоконсервацию, при необходимости.

[001789] Выполняют анализы на эндотоксин, ИФН-γ, стерильность и другие анализы по мере необходимости на полученных образцах из криофлаконов.

ПРИМЕР 12: ПРИМЕРЫ ПРОЦЕССА GEN 3 (ТАКЖЕ НАЗЫВАЕМОГО GEN 3.1)

ЦЕЛЬ

[001790] В указанном описании описаны дальнейшие исследования, касающиеся «сопоставимости процессов Gen 2 и Gen 3 для размножения TIL». Процесс Gen 3 был модифицирован таким образом, чтобы включать этап активации в начале процесса с целью увеличения итогового общего выхода жизнеспособных клеток (TVC), сопоставимого (или превосходящего) выход в Gen 2, при сохранении фенотипических и функциональных профилей, наблюдавшихся ранее.

КРАТКИЙ ОБЗОР

[001791] Оценивали выход TVC за счет включения этапа активации культивируемых фрагментов опухолей на 0 день.

[001792] Продемонстрирована сопоставимость в отношении функциональных и

расширенных фенотипических характеристик со стандартом Gen 3, а также с контрольной группой исследования для опухолей от двух независимых пациентов.

[001793] Анализировали потребление среды и продукцию метаболитов, чтобы подтвердить, что параметры при обработке поддерживались на физиологических уровнях.

[001794] Все запуски в указанном примере выполняли на полномасштабной платформе с использованием коммерческой донорной опухолевой ткани в качестве исходного материала.

ИНФОРМАЦИЯ

[001795] Вариант реализации процесса Gen 3 был модифицирован как дополнительный вариант реализации и в указанном примере называется Gen 3.1.

Концепция производства TIL в Gen 3.1 предусматривает вмешательство оператора 4 раза:

1. Выделение и активация фрагментов опухоли: на 0 день процесса опухоль разделяли, итоговые полученные фрагменты имели размер ~ 3×3 мм каждый (всего до 240 фрагментов) и их культивировали в 1-4 колбах G-Rex100MCS. Каждый флакон содержал до 60 фрагментов, 500 мл среды CM1 или DM1, и добавленные 6000 МЕ рчИЛ-2, 15 мкг OKT3 и $2,5\times10^8$ облученных аллогенных мононуклеарных клеток. Культуру инкубировали при 37°C в течение 6-8 дней.

2. Реактивация культуры TIL : на 7-8 день в культуру медленно добавляли среду CM2 или DM1, в обоих случаях дополненную 6000 МЕ рчИЛ-2, 30 мкг OKT3 и 5×10^8 облученных аллогенных мононуклеарных клеток. По возможности старались не повредить клетки на дне флакона. Культуру инкубировали при 37°C в течение 3-4 дней.

3. Масштабирование культуры: проводят на 10-11 день. При масштабировании культуры все содержимое G-Rex100MCS переносили во флакон G-Rex500MCS, содержащий 4 л CM4 или DM2, в обоих случаях с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2. Флаконы инкубировали при 37°C в течение 5-6 дней до сбора.

4. Сбор/промывание/получение готового состава: На 16-17 день уменьшали объем во флаконах и объединяли их. Клетки концентрировали и промывали PlasmaLyte A pH 7,4 с 1% ЧСА. Из промытой суспензии клеток получали готовый состав с CryoStor10 в отношении 1:1 с добавлением рчИЛ-2 до конечной концентрации 300МЕ/мл.

[001796] DP криоконсервировали с контролируемой скоростью замораживания и помещали на хранение в парах жидкого азота. *полная стандартная среда для TIL 1, 2 или 4 (CM1, CM2, CM4) может быть заменена на бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, называемую средой с определенным составом (DM1 или DM2), как указано выше. Общее описание процесса представлено, например, на фиг. 70 и 71.

Описание процесса

[001797] На день 0 опухоль 3 раза промывали, после чего фрагментировали на 3×3x3 итоговые фрагменты. После того, как вся опухоль была фрагментирована, итоговые фрагменты равномерно рандомизировали и разделяли на три пула. В каждую группу исследования включали один рандомизированный пул фрагментов, добавляя равное

количество фрагментов на три экспериментальных матрицы.

[001798] Размножение опухоли L4063 выполняли на стандартной среде, а размножение опухоли L4064 выполняли на среде с определенным составом (CTS OpTmizer) на протяжении всего процесса размножения TIL. Компоненты указанных сред описаны в настоящем документе.

[001799] CM1, полная среда 1: RPMI+ глутамин с добавлением 2 мМ Glutamax, 10% AB сыворотки человека, гентамицин (50 мкг/мл), 2-меркаптоэтанол (55 мкМ). Итоговый состав среды, дополненной 6000МЕ/мл ИЛ-2

[001800] CM2, полная среда 2: 50% среды CM1+50% среды AIM-V. Итоговый состав среды, дополненной 6000МЕ/мл ИЛ-2

[001801] CM4, полная среда 4: AIM-V с добавлением Glutamax (2 мМ). Итоговый состав среды, дополненной 3000МЕ/мл ИЛ-2

[001802] Базальная среда для размножения Т-клеток CTS OpTmizer CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium, дополненная добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л).

[001803] DM1: CTS™OpTmizer™ T-Cell Expansion Basal Medium, дополненная добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л) и заменителем сыворотки CTS™ Immune Cell SR (3%), с Glutamax (2 мМ). Получение итогового состава с добавлением 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001804] DM2: Базальная среда для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненная добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л) и заменителем сыворотки CTS™ Immune Cell SR (3%), с Glutamax (2 мМ). Итоговый состав с добавлением 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

[001805] Все используемые типы сред, *m.e.* полную среду (CM) и среду с определенным составом (DM), готовили заранее, держали при 4°C до дня использования и нагревали при 37°C в инкубаторе заранее, до 24 часов до дня процесса.

[001806] Реактивация культуры TIL происходила на 7 день для обеих опухолей. Масштабирование происходило на 10 день для L4063 и 11 день для L4064. Обе культуры собирали и криоконсервировали на 16 день.

Ожидаемые результаты

[001807] Gen 3.1 может обеспечивать большее общее число жизнеспособных клеток при сборе на 16-17 день по сравнению с Gen 3.0.

[001808] В Gen 3.1 могут быть продуцированы уровни ИФНγ после рестимуляции, аналогичные Gen 3.0.

[001809] Gen 3.1 и Gen 3.0 могут обеспечивать аналогичное клональное разнообразие, измеренное по общему количеству уникальных последовательностей CDR3, присутствующих в конечном продукте TIL.

[001810] Фенотипические характеристики в процессе Gen 3.1 могут быть аналогичны Gen 3.0.

ДОСТИГНУТЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

[001811] Подсчитывали клетки и определяли% жизнеспособности для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1. При любых условиях размножение происходило согласно описанию в настоящем примере.

Общее количество жизнеспособных клеток и кратность размножения

[001812] Для каждой опухоли фрагменты были разделены на три равных по количеству пула. Из-за небольшого размера опухолей максимальное количество фрагментов на флакон не было достигнуто. Для трех различных процессов оценивали общее количество жизнеспособных клеток и жизнеспособность клеток для каждого условия. Подсчитанное количество клеток определяли как TVC на 7 день для реактивации, TVC на 10 день (L4064) или 11 день (L4063) для масштабирования и TVC при сборе на 16/17 день.

[001813] Подсчет клеток для 7 дня и дня 10/11 проводили только для сведения. Кратность размножения рассчитывали путем деления TVC в день сбора 16/17 на TVC в день реактивации 7. Для сравнения трех групп исследования TVC в день сбора делили на количество фрагментов, добавленных в культуру на 0 день, чтобы рассчитать среднее количество жизнеспособных клеток на фрагмент.

[001814] Проводили подсчет клеток и анализы жизнеспособности для L4063 и L4064. Как показано на фиг. 73, процесс Gen 3.1 Тест обеспечивал получение большего количества клеток на фрагмент, чем процесс Gen 3.0, для обеих опухолей.

[001815] Фиг. 74: Общее количество жизнеспособных клеток и кратность размножения

% жизнеспособности в ходе процесса

[001816] При реактивации, масштабировании и сборе определение процента жизнеспособности выполняли для всех условий. На 16/17 день сбора итоговое значение TVC сравнивали с критериями выпуска, касающихся % жизнеспособности. Во всех оцениваемых условиях результаты превосходили критерий 70% жизнеспособности, и были сопоставимы для разных процессов и опухолей, как показано на рисунке 74.

Иммунофенотипирование

[001817] Определение фенотипических характеристик в итоговом продукте TIL.

[001818] Итоговые продукты подвергали проточно- цитометрическому анализу для тестирования чистоты, дифференцировки и маркеров памяти. Процентное содержание в популяциях TCRα/β, CD4+ и CD8+ клеток были сопоставимыми для всех условий.

[001819] Был проведен расширенный фенотипический анализ REP TIL. Продукт TIL продемонстрировал более высокий процент клеток CD4+ для условий Gen 3.1 по сравнению с Gen 3.0 для обеих опухолей, и более высокий процент клеток CD28+ в популяции CD8+ для условий Gen 3.0 по сравнению с Gen 3.1, в обоих условиях.

[001820] TIL, собранные в процессах Gen 3.0 и Gen 3.1, продемонстрировали сопоставимые показатели фенотипических маркеров, таких как экспрессия CD27 и CD56 на CD4+ и CD8+ клетках, и сопоставимую экспрессию CD28 на популяции гейтированных по CD4+ клеток. На Фиг. 75 представлены фенотипические маркеры итогового продукта

TIL для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1. Фиг. 75: Фенотипические характеристики итогового продукта TIL для L4063 и L4064.

Сравнение маркеров клеток памяти в итоговом продукте TIL:

[001821] На Фиг. 76 представлены маркеры памяти конечного продукта TIL, которые определяли с помощью многоцветной проточной цитометрии. Замороженные образцы TIL, собранные на 16 день, окрашивали для анализа. Статус памяти TIL был сопоставимым для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1. Фиг. 76: Анализ маркеров памяти продукта TIL для L4063 и L4064.

Сравнение маркеров активации и истощения в итоговом продукте TIL:

[001822] На фиг. 77 и 78 приведены данные для активации и истощения итогового продукта TIL, определенные с применением многоцветной проточной цитометрии. Маркеры активации и истощения были сопоставимыми для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 при гейтировании по клеткам CD4+ (фиг. 77) и CD8+ (фиг. 78). Фиг. 77: Маркеры активации и истощения при гейтировании по CD4+ клеткам для L4063 и L4064. Таблица 78: Маркеры активации и истощения при гейтировании по CD8+ клеткам для L4063 и L4064.

Секреция интерферона гамма после рестимуляции:

[001823] Собранные TIL рестимулировали в течение ночи на покрытых антителом против CD3 планшетах для L4063 и L4064. Для двух проанализированных опухолей наблюдалось более высокое продуцирование ИФНγ в процессе Gen 3.1 по сравнению с процессом Gen 3.0. Продуцирование ИФНγ для каждого условия представлено на фиг. 79. Фиг. 79: продуцирование ИФН-γ (пг/мл) в итоговым продуктом в процессах Gen 3.0 и Gen 3.1.

Измерение уровней ИЛ-2 в культуральной среде

[001824] Для сравнения уровней потребления ИЛ-2 во всех условиях и всех процессах супернатанты клеток собирали при инициации реактивации на 7 день, при масштабировании на 10 день (L4064)/11 день (L4063) и на 16/17 день сбора, и замораживали. Впоследствии супернатанты размораживали и затем анализировали. Количество ИЛ-2 в супернатанте клеточной культуры измеряли согласно протоколу производителя. Данные представлены на фиг. 80.

[001825] В целом процессы Gen 3 и Gen 3.1 были сопоставимы в отношении потребления ИЛ -2 на протяжении всего процесса, при оценке в одинаковых условиях среды. Фиг. 80: Анализ концентрации ИЛ-2 (пг/мл) в отработанной среде, собранной от L4063 и L4064.

Анализ метаболитов

[001826] Супернатанты отработанной среды собирали из L4063 и L4064 при инициации реактивации на 7 день, масштабировании на 10 день (L4064) или 11 день (L4063) и при сборе на 16/17 дни для L4063 и L4064, для каждого условия. Супернатанты анализировали на биоанализаторе CEDEX на концентрацию глюкозы, лактата, глутамина, Glutamax и аммиака. На Фиг. 81 приведена концентрация глюкозы в отработанной среде,

собранной в процессах Gen 3.0 и Gen 3.1 для опухолей L4063 и L4064.

[001827] Среда с определенным составом содержит более высокую концентрацию глюкозы 4,5 г/л по сравнению с полной средой (2 г/л). В целом, концентрация и потребление глюкозы были сопоставимы для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 при каждом типе среды. Фиг. 81: Концентрация глюкозы (г/л) в отработанной среде для L4063 и L4064.

[001828] Увеличение уровней лактата наблюдалось для обеих опухолей, L4063 и L4064, для всех тестовых условий. Увеличение уровней лактата было сопоставимым для условий Gen 3.0 и Gen 3.1 и двух сред, используемых для размножения после реактивации (полная среда для L4063 и среда с определенным составом для L4064).

[001829] На Фиг. 82 приведена концентрация лактата в отработанной среде, собранной в условиях процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 для обеих опухолей, L4063 и L4064. Фиг. 82: Концентрация лактата (г/л) в отработанной среде для L4063 и L4064.

[001830] В случае L4063 стандартная базальная среда содержала 2 мМ L-глутамина и была дополнена 2 мМ Glutamax для компенсации естественного разложения L-глутамина в условиях культивирования до L-глутамата и аммиака.

[001831] Использованная для опухоли L4064 среда с определенным составом (бессывороточная) не содержала L-глутамина в базальной среде и была дополнена только Glutamax до конечной концентрации 2 мМ. Glutamax представляет собой дипептид L-аланина и L-глутамина, более стабилен, чем L-глутамин, в водных растворах, и не разлагается спонтанно на глутамат и аммиак Вместо этого указанный дипептид постепенно диссоциирует на индивидуальные аминокислоты, таким образом поддерживая более низкую, но достаточную концентрацию L-глутамина для сохранения устойчивого клеточного роста. На фиг. 83 и 84 приведены концентрации глутамина и Glutamax, соответственно, в отработанной среде, собранной в условиях процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 для обеих опухолей L4063 и L4064.

[001832] В случае L4063 концентрация глутамина и Glutamax немного снижалась в день масштабирования, но в день сбора наблюдалось повышение до аналогичных или близких уровней по сравнению с днем реактивации. В случае L4064 наблюдалось некоторое снижение концентрации глутамина и Glutamax с аналогичными показателями в разных условиях, на протяжении всего процесса. Фиг. 83: Концентрация глутамина (ммоль/л) в отработанной среде для L4063 и L4064. Фиг. 84: Концентрация Glutamax (ммоль/л) в отработанной среде для L4063 и L4064.

[001833] Фиг. 85 Концентрация аммиака в отработанной среде, собранной в процессах Gen 3.0 и Gen 3.1 для обеих опухолей L4063 и L4064. Как и ожидалось, концентрации аммиака были выше для L4063 (культивированной в стандартной среде, содержащей 2 мМ глутамина+2 мМ Glutamax), чем для L4064 (выращенной в среде с определенным составом, содержащей 2 мМ Glutamax). Далее, как и ожидалось, наблюдалось постепенное увеличение уровней или накопление аммиака в процессе культивирования. Концентрации аммиака не различались в трех различных тестовых

условиях. Фиг. 85: Концентрация аммиака (ммоль/л) в отработанной среде для L4063 и L4064.

Теломерные повторы в анализе Flow-FISH:

[001834] Технологию Flow-FISH использовали для измерения средней длины теломерного повтора на L4063 и L4064 в рамках процессов Gen 3 и Gen 3.1. Относительную длину теломер (RTL) определяли с применением набора Telomere PNA /FITC для проточно-цитометрического анализа от DAKO. Был проведен анализ теломер.

[001835] Длину теломер в образцах L4063 и L4064 сравнивали с контрольной линией клеток (лейкоз, 1301). Контрольная линия клеток представляет собой тетраплоидную линию клеток, имеющую длинные стабильные теломеры, что позволяет рассчитать относительную длину теломер. Процессы Gen 3 и Gen 3.1, оцененные на обеих опухолях, продемонстрировали сопоставимую длину теломер, как показано на фиг. 86. Фиг. 86: Обзор относительной длины теломер (RTL) в сравнении с контрольной (1301) линией клеток.

Анализ репертуара TCR Vβ

[001836] Для определения клонального разнообразия клеточных продуктов, полученных в каждом процессе, итоговый продукты TIL оценивали в анализе клонального разнообразия путем секвенирования CDR3-части Т-клеточных рецепторов.

[001837] Три показатели сравнивали для тех условий:

Индекс разнообразия уникальных CDR3 (uCDR3)

% общих uCDR3

Для лидирующих 80% uCDR3:

Сравнение % общих копий uCDR3

Сравнение частоты уникальных клонотипов

[001838] Фиг. 87: Обзор репертуара TCR Vβ для L4063 и L4064. Описывает клональность TIL для конечного продукта TIL на опухоли L4063 и L4064 в условиях Gen 3 и Gen 3.1, по оценке на основании репертуара TCR Vβ.

[001839] Фиг. 89: Сравнение Gen 3, Gen3.1 Контроль и Gen 3.1 Тест, процент общих уникальных последовательностей CDR3 на L4063 в собранном клеточном продукте TIL: 975 последовательностей являются общими для итогового продукта Gen 3 и тестового Gen 3.1, что эквивалентно 88% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 3, общих с итоговым продуктом тестового Gen 3.1.

[001840] Фиг. 88: Сравнение частоты уникальных последовательностей CDR3 в собранном итоговом клеточном продукте TIL процессов Gen 3.0 и Gen 3.1 для L4063.

[001841] Фиг. 90: Сравнение Gen 3 и Gen3.1 Контроль и Gen 3.1 Тест, процент общих уникальных последовательностей CDR3 на L4064 в собранном клеточном продукте TIL: 2163 последовательностей являются общими для Gen 3 и итоговый продукт тестового Gen 3.1, что эквивалентно 87% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 для Gen 3, общих с итоговым продуктом тестового Gen 3.1.

[001842] Фиг. 91: L4064 Частота сравнение уникальных последовательностей

CDR3 в собранном итоговом клеточном продукте процессов Gen 3.0 и Gen 3.1.

[001843] Количество уникальных последовательностей CD3, идентифицированных в 1×10^6 клетках, собранных в день сбора 16, для разных процессов. В условиях тестового Gen 3.1 наблюдалось несколько большее клональное разнообразие по сравнению с Gen 3.0 по оценке на основании количества уникальных пептидных CDR в образце.

[001844] Индекс разнообразия (энтропии) Шеннона представляет собой более надежную и распространенную метрику для сравнения; для условий Gen 3.1 на обеих опухолях продемонстрировано незначительно большее разнообразие по сравнению с процессом Gen 3, что предлагает, что репертуар TCR Vβ в условиях тестового Gen 3.1 обладает большей поликлональностью, чем при процессе Gen 3.0.

[001845] Кроме того, продемонстрировано, что репертуар TCR Vβ для условий тестового Gen 3.1 более чем на 87% перекрывается с соответствующим репертуаром для процесса Gen 3.0 на обеих опухолях, L4063 и

L4064.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

[001846] Значение концентрации ИЛ-2 в отработанной среде L4064 для процесса Gen 3.1 Тест в день реактивации было ниже ожидаемого значения (аналогично условиям Gen 3.1 Контроль и Gen 3.0).

[001847] Низкое значение могло быть обусловлено ошибкой при пипетировании, но ввиду минимального размера взятого образца невозможно было повторить анализ.

[001848] Отработанную среду после масштабирования на 10/11 день на образце L4064 не собирали и не включали в анализ концентрации ИЛ-2 и анализ метаболитов в супернатанте.

ВЫВОДЫ

[001849] В условиях Gen 3.1 ТЕСТ, включавших фидерные клетки и OKT-3 на 0 день, наблюдалось более высокое значение TVC для доз клеток в день сбора 16 по сравнению с процессами Gen 3.0 и Gen 3.1 Контроль. Значение TVC для итогового продукта в условиях Gen 3.1 Тест было примерно в 2,5 раза выше, чем для Gen 3.0.

[001850] В условиях Gen 3.1 Тест при добавлении OKT-3 и фидерных клеток на 0 день для обеих опухолей L4063 и L4064 была достигнута максимальная емкость флакона при сборе. В указанных условиях при инициации в 0 день максимального числа флаконов - 4, итоговая доза клеток может составлять 80-100E+09 TIL.

[001851] Все атрибуты качества, такие как фенотипические характеристики, включающие маркеры чистоты, истощения, активации и памяти в итоговом продукте TIL, сохранялись и были сопоставимы для процессов Gen 3.1 Тест и Gen 3.0. Показатели длины теломер на итоговом продукте TIL и потребления ИЛ-2 в отработанной среде были сопоставимы для процессов Gen 3.0 и Gen 3.1.

[001852] Продуцирование ИФН-гамма в итоговом продукте TIL было в 3 раза выше для процесса Gen 3.1, включавшего фидерные клетки и добавление OKT-3 на 0 день, по сравнению с Gen 3.0 в двух проанализированных опухолях, что позволяет

предположить, что процесс Gen 3.1 обеспечивает получение более активного продукта TIL.

[001853] Никаких различий уровней глюкозы или лактата при разных условиях тестирования не наблюдалось. Никаких различий в отношении глутамина и аммиака в процессах Gen 3.0 и Gen 3.1 при разных условиях среды не наблюдалось. Низкие уровни глутамина в среде не ограничивают рост клеток и позволяют предположить, что добавления только Glutamax в среду достаточно для получения питательных веществ, необходимых для пролиферации клеток.

[001854] Масштабирование для L4063 и L4064 проводили на 11 день и 10 день, соответственно, и значительных различий в отношении количества клеток, достигаемого ко дню сбора в рамках процесса, не наблюдалось, и потребление метаболитов было сопоставимым в обоих случаях на протяжении всего процесса. Указанное наблюдение предполагает потенциальную гибкость оптимизированного процесса Gen 3.0 в отношении дней обработки, способствующую гибкости производственного графика.

[001855] Для процесса Gen 3.1, включавшего фидерные клетки и добавление OKT-3 на 0 день, наблюдалось большее клональное разнообразие, измеренное с применением анализа последовательностей CDR3 TCRab, по сравнению с Gen 3.0.

[001856] На фиг. 92 представлен вариант реализации процесса Gen 3 (Оптимизированный процесс Gen 3). Стандартная среда и бессывороточная среда CTS Optimize могут применяться для оптимизированного процесса размножения TIL Gen 3. В случае использования бессывороточной среды CTS Optimizer рекомендовано увеличить содержание Glutamax в среде до конечной концентрации 4 мМ.

Применимость и сопоставимость:

Осуществимость:

[001857] Осуществимость определяли для всех условий исследования во всех экспериментах. Во всех экспериментах и для всех условий, а также с опухолевой тканью всех доноров все эксперименты проводили с использованием одних и тех же партий ключевых исходных материалов, таких как ИЛ-2, АВ сыворотка человека, аллогенные фидерные клетки, OKT-3.

Сопоставимость:

[001858] Сопоставимость определяли по способности всех групп исследования отвечать критериям выпуска предложенного клинического продукта, соответствующим инфильтрирующим опухоль аутологичным лимфоцитам (TIL) LFP-002, криоконсервированным на 22-й день, представленным на фиг. 93.

ПРИМЕР 13: ПРОЦЕССЫ РАЗМНОЖЕНИЯ ИЗ ОПУХОЛЕЙ НА СРЕДЕ С ЗАДАННЫМ СОСТАВОМ

[001859] Процессы, описанные в примерах 5-12, осуществляют с заменой сред CM1 и CM2 средой с определенным составом в соответствии с настоящим изобретением (*например*, бессывороточной средой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, ThermoFisher, в том числе, например, DM1 и DM2).

ПРИМЕР 14: РАЗМНОЖЕНИЕ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ ТКАНИ ОТ СУБЪЕКТА С РАКОМ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

[001860] В указанном примере описано исследование, проведенное для размножения TIL из полученного от пациента трепанобиоптата опухоли рака поджелудочной железы (P7055). В настоящем примере описан иллюстративный вариант реализации способа размножения TIL из образцов толстоигольных биоптатов тканей.

[001861] Трепанобиоптат опухоли поджелудочной железы, включающий 3 фрагмента опухоли, получали и обрабатывали в соответствии с Gen 2-подобным способом обработки опухоли, описанным ниже. На фиг. 111 представлены этапы процесса для примера Gen 2-подобного протокола.

День 0 - обработка опухоли

[001862] Трепанобиоптаты опухоли получали и промывали согласно описанию в настоящем документе на 0 день реализации способа. Длину и теоретическую массу пробы ткани измеряли с использованием линейки и регистрировали.

День 0 - Gen 2-подобный процесс (пре-REP)

[001863] G-Rex 100M маркировали, отмечая ID опухоли, процесса (Gen 2), инициалы, состав среды и дату. 0,5 л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2 нагретых до 37°C (в течение по меньшей мере 24-30 ч) добавляли в G-Rex 100M. Использовали 6-луночный планшет; по 5 мл промывочного буфера для опухоли добавляли в три лунки, помеченные как «№ 1», «№ 2» и «№ 3». Вкратце, все содержимое раствора из контейнера с трепанобиоптатами переносили в чашку Петри (размером 100 мм или 150 мм).

[001864] Образец промывали трижды путем переноса образца трепанобиопсии в лунку 1 пастеровской пипеткой. Образец инкубировали в течение 3 мин. Затем пробы переносили в лунку № 2 на 3 мин, и затем в лунку № 3 на 3 мин.

[001865] Используя пипетку для переноса материала или щипцы, биоптаты добавляли непосредственно из лунки № 3 в маркированный G-Rex 100M с 0,5 л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2, подготовленный на предыдущем этапе. G-Rex 100M помещали в инкубатор с 37°C/5% CO_2 до дня 11.

День 3 - Gen 2-подобный процесс (Сбор до REP/Активация)

[001866] День 3 Gen 2-подобного процесса проводили следующим образом. Фидерные клетки (аллогенные фидерные МКПК) получали из объединенной популяции МКПК от 2 или более разных доноров. Фидерные клетки подвергали минимальным манипуляциям и замораживали до использования. 2×1 со флакона фидерных клеток (аллогенные фидерные клетки МКПК) размораживали и пипетировали в 48 мл CM-1+6000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретые до 37°C.

[001867] Фидерные МКПК тщательно перемешивали с применением а серологической пипетки и извлекали 4×1 мл аликвоты. Размороженные фидерные клетки подсчитывали без разведения в соответствии со стандартными процедурами, известных специалистам в данной области техники. Затем рассчитывали объем, необходимый для

100e6 фидерных МКПК, в соответствии с уравнением: 100e6/средняя концентрация живых клеток=объем, необходимый для 100e6 МКПК.

[001868] Флакон(ы) G-Rex 100M, содержащие пре-REP культуру, вынимали из инкубатора и помещали в бокс биологической безопасности (BSC).

[001869] Рассчитанный выше объем и 30 мкл стокового раствора OKT3 (30 нг/мл) добавляли в каждый флакон G-Rex 100M, содержащий 500 мл CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2. В каждый флакон добавляли достаточное количество (QS) для доведения общего объема до 1 л: 500 мл - расчетный объем МКПК, добавленных в каждый флакон=общий объем CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2.

День 11 - Gen 2-подобный процесс (REP)

[001870] День 11 Gen 2-подобного процесса проводили следующим образом. Для этапа сбора пре-REP TIL использовали открытый флакон (открытую систему). Флакон G-Rex 100M, содержащий культуру, извлекали из инкубатора, отбирали 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов, и помещали на хранение -80ºC. Взвешивали стерильную сосуд на 150 мл и регистрировали массу. Приблизительно 900 мл супернатанта извлекали из флакона G-Rex 100M аспирацией. Для переноса культуры пре-REP TIL во взвешенный стерильный флакон на 150 мл использовали серологическую пипетку.

[001871] Культуру пре-REP TIL тщательно перемешивали серологической пипеткой и собирали аликвоты 4×1 мл для подсчета клеток. Клетки подсчитывали 4 раза без разбавления в соответствии со стандартными процедурами, известными специалистам в данной области. Культуру пре-REP TIL помещали в инкубатор на время выполнения подсчетов.

[001872] При превышении максимального количества (200e6 TIL) для посева в культуру REP лишние клетки удаляли из культуры пре-REP TIL, используя шприц на 100 мл с дозатором Ashton. 200e6 TILS переносили в пакет EV-1000N через голубой порт NIS.

[001873] Пакет EV-1000N с пре-REP TIL стерильно присоединяли припаиванием к красной линии G-Rex 500MCS, и TIL самотеком поступали во флакон. После перемещения клеток красную линию отсоединяли запаиванием.

[001874] 5e9 фидерных МКПК размораживали согласно описанию выше. После проведения 4 подсчетов клеток объем фидерной культуры корректировали на основании количества клеток, требуемого для добавления 5e9 фидерных клеток в фидерный пакет EV1000N. После добавления фидерных клеток в фидерный пакет добавляли 150 мкл OKT3. Фидерный пакет стерильно присоединяли припаиванием к красной линии G-Rex 500MCS и 5e9 фидерных клеток самотеком поступали в G-Rex. 4,5 л CM2 и 3000 МЕ/мл ИЛ-2 добавляли в G-Rex 500MCS.

День 16 - Gen 2-подобный процесс (Разделение)

[001875] День 16 Gen 2-подобного процесса проводили в соответствии с днем 16 способа Gen 2 (см., например, таблицу 21 из примера 5).

[001876] Сначала отбирали 2 x 1 мл аликвоты супернатанта для анализа

метаболитов и помещали на хранение при -80ºC. Вкратце, объем уменьшали, и культуру клеток REP разделяли по нескольким (до 5) G-REX 500MCS. Каждый флакон G-REX 500MCS содержал культуральный объем 4,5 л среды CM4+ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) + $\geq 1 \times 10^9$ TVC/флакон.

День 22 - Gen 2-подобный процесс (Сбор)

[001877] День 22 Gen 2-подобного процесса проводили в соответствии с днем 22 способа Gen 2 (см., например, таблицу 21 из примера 5).

[001878] На день 22 клетки собирают, обрабатывают в LOVO (Сбор TIL, 2 цикла) и замораживают в 30×1 мл криофлаконах (1:1 CS10:PLLA с 1% ЧСА), используя программу CRF № 1. В некоторых случаях присутствовал только 1 флакон и данные для всех дополнительных дочерних флаконов были экстраполированы для определения гипотетического выхода.

[001879] 10e6 пост-LOVO клеток оставляли для проведения окрашивания в анализе идентичности до замораживания. Перед утилизацией супернатанта извлекали 2 x 1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и помещали на хранение при -80ºC.

Результаты

[001880] Подсчет TVC на 11 день (Активация) показал наличие 47,3e6 клеток. Подсчет TVC на 22 день (REP) после LOVO показал наличие 10,4e9 клеток при 93% жизнеспособности. Соответственно, с 11 по 22 день Gen 2-подобного процесса происходило 8,4 удвоений количества клеток.

ПРИМЕР 15: GEN 2-ПОДОБНЫЙ ПРОЦЕСС И ПРОЦЕСС GEN 3 ДЛЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ОПУХОЛЬ ЛИМФОЦИТОВ ИЗ ТРЕПАНОБИОПТАТОВ ТКАНИ

[001881] В этом примере описывается исследование, в котором сравнивали размножение TIL из образцов трепанобиопсии опухоли рака поджелудочной железы с использованием Gen 2-подобного процесса и процесса Gen 3. В данном исследовании используют трепанобиоптаты опухоли от пациента с раком поджелудочной железы (P7057). Указанный образец опухоли включает 3 трепанобиоптата и продукты TIL получают в соответствии с Gen 2-подобным процессом, описанным в настоящем документе. В данном исследовании также используется трепанобиопсия опухоли пациента с раком поджелудочной железы (P7058). Указанный образец опухоли включает 8 трепанобиоптатов, при этом продукты TIL получают в соответствии с Gen 2-подобным процессом; и 4 трепанобиоптата используют в соответствии с процессом Gen 3 согласно описанию в настоящем документе.

Введение

[001882] Толстоигольная биопсия - стандартная предварительная диагностическая процедура, используемая для получения образцов аберрантного разрастания тканей при диагностике рака. Для данной процедуры используют иглы большого калибра (18, 16, 14 и т.п.) для чрескожного взятия из подозрительной области образцов, которые затем подвергают дальнейшему анализу и тестированию, чтобы определить, является ли ткань

злокачественной. Поскольку толстоигольная биопсия не требует разреза или хирургического вмешательства, она представляет собой гораздо менее инвазивный способ взятия образцов опухолей. Таким образом, желательно рассматривать возможность проведения трепанобиопсии в качестве альтернативы резекции опухоли для взятия исходного материала, используемого в описанных процессов получения TIL.

Область техники

[001883] Два процесса получения (технологические процессы Gen 2 и Gen 3) были разработаны и используются в клиническом производстве для размножения ex vivo аутологичных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученных из недавно резецированных опухолей. В процессах Gen 2 и Gen 3 используются одни и те же биореакторы (G-Rex100 MCS и G-Rex500 MCS). Процесс Gen 2 включает этап, осуществляемый до протокола быстрого размножения («Pre-Rapid Expansion Protocol», пре-REP), и этот этап заменен на этап активации в процессе Gen 3. Быстрое размножение (REP) и масштабирование культуры TIL в процессах размножения культур клеток Gen 2 и Gen 3 проводят в присутствии интерлейкина-2 (ИЛ-2), моноклонального антитела OKT3 и облученных мононуклеарных клеток периферической крови («Фидерные клетки»), которые способствуют размножению TIL. Продолжительность процесса Gen 3 меньше, чем продолжительность процесса Gen 2. Процессы Gen 2 и Gen 3 были взяты в качестве основы для разработки процесса с использованием трепанобиоптатов

Цель

[001884] Целью данного исследования была разработка процесса получения TIL с использованием биопсийной пробы в качестве исходного материала. Дизайн указанного процесса получения основан на дизайне клинических процессов получения, Gen 2-подобного процесса и Gen 3, описанных в настоящем документе.

Краткий обзор

[001885] Полномасштабные исследования выполняют с использованием процессов Gen 2 и Gen 3 (см., например, примеры выше). Два изменения внесено в Gen 2-подобный процесс относительно процесса Gen 2, включая 3-дневный пре-REP (а не 11 дней, как для Gen 2) и этап активации на 3-й день путем добавления фидерных клеток и OKT-3 на 3-й день.

[001886] Основные различия в дизайне процессов между Gen 2-подобным процессом и Gen 3 заключаются в следующем. Наличие «предваряющего быстрое размножение» протокола Pre-Rapid Expansion Protocol (Pre-REP) в Gen 2-подобном процессе, при котором клетки выходят из столбика ткани или биоптата в течение 3-дневного инкубационного периода в присутствии ИЛ-2, но в отсутствие OKT-3 и фидерных клеток. Соответствующий этап в процессе Gen 3 объединяет выход TIL из опухоли с их активацией за счет добавления OKT-3 и фидерных клеток на 0 день.

[001887] Протокол быстрого размножения в процессе Gen 2 включает однократную активацию с использованием добавленных OKT3 и фидерных клеток к пре-REP TIL в течение 11 дней с разделением культур на 16 день Соответствующий протокол REP в

процессе Gen 3 также задействует OKT3 и фидерные клетки, добавленные на 7/8 День при масштабировании на 11 День.

[001888] В процессе Gen 2 используются G-Rex 100 MCS для пре-REP и G-Rex 500 MCS для REP. В процессе Gen 3 используются G-Rex 100 MCS для активации и реактивации, и G-Rex 500 MCS для масштабирования.

[001889] Продолжительность процесса Gen 3 составляет 16-17 дней в отличие от 22 дней для процесса Gen 2 (то есть Gen 3 на 5-6 дней быстрее, чем Gen 2).

[001890] В процессе Gen 3 используется среда с определенным составом (т.е. не содержащая АВ сыворотки человека), тогда как в процессе Gen 2 используется полная среда, содержащая сыворотку АВ человека.

[001891] На рисунке 111 представлено сравнение процессов Gen 2 и Gen 3, описанных в настоящем документе.

Процедуры

[001892] В указанном разделе примеров описан Gen 2-подобный процесс для получения продукта TIL из ткани образца трепанобиоптата опухоли поджелудочной железы P7057. Gen 2-подобный процесс и процесс Gen 3, описанные ниже, используют для получения продукта TIL из тканей образца трепанобиоптата опухоли поджелудочной железы P7058.

[001893] В указанном исследовании используют трепанобиоптаты/образцы биопсии опухолей, полученные от коммерческих поставщиков, сотрудников или партнеров. Аллогенные фидерные клетки МКПК собирают от 2 или более разных доноров. Фидерные клетки подвергают минимальным манипуляциям и добавляют непосредственно к культуре TIL в матрице для криоконсервации, состоящей из мононуклеарных клеток, суспендированных в CS10.

Общее описание Gen 2-подобного процесса

День 0 - Gen 2-подобный процесс (обработка опухоли)

[001894] Обработку опухоли согласно Gen 2-подобному способу осуществляют следующим образом. Получают трепанобиоптаты опухоли и три раза промывают. Длину и теоретическую массу каждого столбика ткани измеряют линейкой и регистрируют.

День 0 - Gen 2-подобный процесс (пре-REP)

[001895] На 0 день Gen 2-подобного процесса инициируют фазу Пре-REP следующим образом. G-Rex 100M маркируют, отмечая ID опухоли, процесса (Gen 2), инициалы, состав среды и дату. 0,5 л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2 нагретых до 37°C (в течение по меньшей мере 24-30 ч) добавляют в G-Rex 100M. Используют 6-луночный планшет; по 5 мл промывочного буфера для опухоли добавляют в три лунки, помеченные как «1», «2» и «3». Вкратце, все содержимое раствора из контейнера с трепанобиоптатами переносили в чашку Петри (размером 100 мм или 150 мм). Образец промывали трижды путем переноса образца трепанобиопсии в лунку 1 пастеровской пипеткой. инкубируют в течение 3 мин. Затем пробы переносят в лунку 2 на 3 мин, а затем в лунку 3 на 3 мин. Используя пипетку для переноса материала или щипцы, биоптаты добавляют

непосредственно из лунки 3 в маркированный G-Rex 100M с 0,5 л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2, подготовленный на предыдущем этапе. G-Rex 100M помещают в инкубатор с 37ºC/5% CO_2 до дня 11.

День 3 - Gen 2-подобный процесс (Сбор пре-REP /Активация)

[001896] На 3 день Gen 2-подобного процесса осуществляют сбор/активацию пре-REP следующим образом. Размораживают 2 флакона МКПК по 1 мл и пипетируют в 48 мл CM-1+6000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретую до 37ºC. Тщательно перемешивают серологической пипеткой и извлекают 4×1 мл аликвоты, подсчитывают размороженные фидерные клетки согласно стандартным способам без разведения. Рассчитывают необходимый объем для 100e6 МКПК: (100e6/средняя концентрация живых клеток=Объем, необходимый для 100e6 МКПК). Вынимают флакон(ы) G-Rex 100M, содержащие культуру, из инкубатора и помещают в BSC. Добавляют рассчитанный как указано выше объем, и по 30 мкл стокового раствора OKT3 (30 нг/мл) добавляют в каждый флакон, содержащий 500 мл CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2; общий объем доводят до 1 л: 500 мл - объем, добавленный в 10.5.6. = общий объем CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2 добавляли во флакон.

День 11 - Gen 2-подобный процесс (REP)

[001897] На 11 день Gen 2-подобного процесса инициируют фазу REP, совпадающую с 11 днем процесса Gen 2, за исключением проведения пре-REP сбора TIL и высевания в G-Rex 500MCS. Для этапа сбора пре-REP TIL использовали открытый флакон (открытую систему). Вынимают флакон из инкубатора и извлекают 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и помещают на хранение при -80ºC. Взвешивают стерильный сосуд на 150 мл и регистрируют массу. Аспирацией извлекают ~ 900 мл супернатанта. Используют серологическую пипетку для переноса пре-REP TIL во взвешенный стерильный флакон на 150 мл. Тщательно перемешивают с помощью серологической пипетки и получают 4×1 мл аликвоты для подсчета клеток. Выполняют 4 подсчета клеток без разведения на NC-200 стандартным способом. Пре-REP TIL держат в инкубаторе во время подсчета клеток.

[001898] При необходимости из флакона удаляют подходящий объем, чтобы оставить 200e6 TIL (максимальное количество для посева в REP) и используют шприц объемом 100 мл с дозатором Ashton для переноса оставшихся TIL (200e6 TIL) в пакет EV-1000N через голубой NIS-порт. Стерильным образом подсоединяют пакет EV-1000N пакет с пре-REP TIL, припаивая его к красной линии RED G-Rex 500MCS, и сливают TIL самотеком во флакон. После перемещения клеток красную линию отсоединяют запаиванием.

[001899] Размораживают 5e9 фидерных клеток в соответствии со способом, описанным выше. После проведения 4 подсчетов клеток корректируют объем, если это необходимо, для получения 5e9 клеток в фидерном пакете EV1000N. Добавляют в фидерный пакет 150 мкл OKT3 Стерильно присоединяют фидерный пакет припаиванием к красной линии G-Rex 500MCS, и 5e9 фидерных клеток самотеком поступают во флакон G-Rex. Добавляют 4,5 л CM2+3000 МЕ/мл ИЛ-2 в G-Rex 500MCS.

День 16 - Gen 2-подобный процесс (Разделение)

[001900] На 16 день Gen 2-подобного процесса осуществляют разделение в соответствии с этапом 16 дня Gen 2 (см. таблицу 21 из примера 5). Извлекали 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и помещали на хранение при -80ºC. День 16 Gen 2-подобного процесса проводят как день 16 процесса Gen 2, за исключением следующего. Если на этап масштабирования/разделения переносят только 1 флакон, количество дочерних флаконов прибавляют при сборе для экстраполяции результатов на полный масштаб. Например, если необходимо 5 флаконов, но переносят только 1, количество TVC в итоговом продукте умножают на 5, чтобы экстраполировать результат на ожидаемый выход при полном масштабе.

День 22 - Gen 2-подобный процесс (Сбор)

[001901] На 22 день Gen-2-подобного процесса проводят этап сбора проводят как для дня 22 процесса Gen 2 (см., например, таблицу 21 из примера 5). Клетки 22 дня Gen 2-подобного процесса собирают, проводят через систему обработки клеток LOVO и замораживают в 30×1 мл криофлаконах (в 1:1 CS10/PLLA 1% ЧСА). В некоторых случаях имеется только 1 флакон и результаты для всех дополнительных дочерних флаконов экстраполированы для определения гипотетического выхода. 10e6 клеток после обработки LOVO оставляют для окрашивания для идентификации до замораживания. До утилизации отработанного супернатанта извлекают 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и помещают на хранение при -80ºC.

Общее описание процесса Gen 3

День 0 - Gen 3 (обработка опухоли)

[001902] Обработку опухоли способа Gen 3 осуществляют согласно описанию в настоящем документе. Получают трепанобиоптаты опухоли и три раза промывают. Длину и теоретическую массу каждого столбика ткани измеряют линейкой и регистрируют.

День 0 - Gen 3 (Активация)

[001903] День 0 Gen 3 проводят в соответствии с описанным процессом (см., например, примеры 5-8). Помещают оставшиеся биопсийные пробы, как указано выше, в колбу G-Rex 100M, содержащую 500 мл DM+6000 МЕ/мл МЛ-2, нагретую до 37 °C. Для каждого используемого флакона размораживают 4×1 мл сосуда с облученными МКПК на водяной бане при 37ºC. Используют пипетку для переноса материала для переноса МКПК в коническую пробирку объемом 50 мл с 46 мл теплой DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2. Тщательно перемешивают серологической пипеткой, извлекают 4 аликвоты по 1 мл и производят подсчет при разведении 1:10 на NC-200 в соответствии с протоколом, описанным в настоящем документе. Рассчитывают объем, необходимый для 250e6 МКПК: (250e6/средняя концентрация=объем, необходимый для 250e6 МКПК). Добавляют расчетный объем с предыдущего этапа в каждый флакон, содержащий 500 мл DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2 и фрагменты опухоли. Добавить 15 мкл стокового раствора OKT-3 (1 мг/мл) в каждый флакон, содержащий 500 мл DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2, фрагменты опухоли и фидерные МКПК. Пометить каждый флакон с указанием следующей информации: «ID

опухоли, Gen 3, номер флакона, инициалы, дата». Поместить в инкубатор с 37ºC/5% CO2 до дня 8.

День 7/8 - Gen 3 (Реактивация)

[001904] На день 7/8 процесс Gen 3 осуществляют как описано, например, в примерах 5-9. Извлекают флакон(ы) G-Rex 100M, содержащие культуру, из инкубатора, и помещают в BSC. Извлекают 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и помещают на хранение при -80ºC. Добавляют 500 мл DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретых до 37ºC, во флакон G-Rex 100M. Добавляют 25 мл DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2, нагретых до 37ºC, в коническую пробирку объемом 50 мл. Размораживают 1 пакет МКПК на 25 мл на водяной бане при 37 °C, вставляют в пакет удлинитель для плазмы, набирают 25 мл шприцем и перемещают в подготовленную коническую пробирку на 50 мл. Производят 4 подсчета клеток либо в разведении 1:10 (100 мкл МКПК в 900 мкл AIM-V), либо в разведении 1:100 (готовят разведение 1:10 согласно описанию, а затем переносят 100 мкл в дополнительные 900 мкл AIM-V) для размороженных фидерные клеток в соответствии со стандартными способами. Рассчитывают объем, необходимый для 500e6 МКПК: (500e6/средняя концентрация=объем, необходимый для 500e6 МКПК). Добавляют расчетный объем МКПК с этапов выше в G-Rex 100M, содержащий 1 л DM+6000 МЕ/мл ИЛ-2 и трепанобиоптаты. Добавляют 30 мкл стокового OKT3 (30 нг/мл) во флакон. Помещают флакон в инкубатор при 37ºC/5% CO2.

День 10/11 - Gen 3 (Масштабирование)

[001905] День 10/11 Масштабирование для процесса Gen 3 осуществляют как описано, например, в примерах 5-10. Флакон(ы) вынимают из инкубатора, извлекают 2×1 мл аликвоты супернатанта для анализа метаболитов и хранят при -80ºC. Стерильным образом припаивают систему переноса жидкостей к красной линии контейнера G-Rex 500MCS, протягивают систему для переноса жидкостей через насос Baxter, и асептически присоединяют дозатор Ashton к другому концу внутри BSC. Переносят ~ 700 мл среды из G-Rex 100MCS в G-Rex 500MCS, выключают насос, вращают, чтобы взболтать клеточный слой и перемещают оставшуюся культуру клеток в G-Rex 500MCS. После переноса всех TIL красную линию G-Rex стерильным образом припаивали к 5 л или 10 л пакету с DM+3K МЕ/мл ИЛ-2, нагретому до 37ºC. Сливают среду до отметки 5 л на флаконе G-Rex 500MCS. После стекания нужного объема флакон возвращают в инкубатор.

День 16/17 - Gen 3 (Сбор)

[001906] На день 16/17 процесс Gen 3 проводили как описано, например, в примерах 5-1. На день 17 клетки для Gen 3 собирают, обрабатывают в LOVO (Сбор TIL, 5 циклов) и замораживают в 30×1 мл криофлаконах (с отношением 1:1 CS10:Plasmalyte с 1% ЧСА) с использованием программы CRF № 1. В некоторых случаях клетки собирают всего из 1 или 2 флаконов, в зависимости от количества фрагментов, высеянных на 0 день. 10e6 пост-LOVO клеток оставляют для окрашивания в анализе на чистоту перед замораживанием.

Характеризация итоговых продуктов и исходных материалов :

[001907] Может быть проведена оценка исходных материалов и итоговых продуктов TIL, полученных в соответствии с Gen 2-подобным процессом и процессом Gen 3. Оценивают идентичность свежего продукта TIL (% CD45+/ CD3+) перед замораживанием с использованием стандартных протоколов. Например, измеряют функцию TIL в отношении продуцирования интерферона-гамма и гранзима B. Стимуляцию TIL измеряют, определяя высвобождение ИФН-гамма. Стимуляцию TIL измеряют, определяя высвобождение гранзима B с применением ELISA. Может быть проведена оценка фенотипа CD107a, расширенного фенотипа, окрашивание поверхностных антигенов на TIL с применением дифференцирующей панели и/или панели активации/истощения. Может быть проведено секвенирование TCRvβ. Могут быть измерены активность теломеразы и длина теломер. Метаболиты могут быть измерены в культуральном супернатанте с помощью анализатора CEDEX Bio-analyzer.

Ожидаемые результаты или критерии приемлемости

[001908] Ожидаемые результаты для пре-REP клеток и итогового продукта Gen 2-подобного процесса, а также итогового продукта процесса Gen 3 представлены в таблицах 30 и 31.

[001909] Таблица 30. Пре-REP тестирование и ожидаемые результаты для Gen 2-подобного процесса

Тип тестирования	**Способ**	**Критерии приемлемости**
Количество клеток/Жизнеспособность	Флуоресценция	> 5×10e6 Жизнеспособных клеток

[001910] Таблица 31. Тестирование итогового продукта и критерии приемлемости (Gen 2-подобный процесс и процесс Gen 3)

Тип тестирования	**Способ**	**Критерии приемлемости**
Тестирование при выпуске		
Жизнеспособность клеток	Флуоресценция	≥ 70%
Общее количество жизнеспособных клеток	Флуоресценция	от 1e9 до 150e9
Идентификация (%CD45+/CD3+)	Проточная цитометрия	Gen 2-подобный: ≥ 90% CD45+CD3+ TIL для всех показаний Gen 3: ≥ 90% CD45+CD3+ TIL кроме рака яичников ≥ 85% CD45+CD3+ TIL для рака яичников

Тип тестирования	Способ	Критерии приемлемости
Продуцирование интерферона-гамма (стимулированные - нестимулированные)	Стимуляция и ИФА ELISA	≥ 500 пг/мл

[001911] Согласно некоторым вариантам реализации тестирование замороженного итогового продукта осуществляют на продуктах, полученных с применением способа, описанного в настоящем документе, такого как GEN 2-подобный способ и способ Gen 3. Согласно некоторым вариантам реализации указанное тестирование включает оценку одного или более из следующего: маркеры дифференцировки, активации и истощения, гранзим B, CD107A, секвенирование TCR vβ, длина теломер, активность теломеразы и метаболиты. В некоторых случаях дифференцировку оценивают с помощью проточной цитометрии, например с помощью проточной цитометрии панели TIL 1. В некоторых случаях маркеры активации и истощения оценивают с помощью проточной цитометрии, например с помощью проточной цитометрии панели TIL 2. В некоторых случаях гранзим B оценивают с использованием стимуляции гранулами и ELISA. В некоторых случаях CD107A оценивают путем стимуляции митогеном и внутриклеточной проточной цитометрии. В некоторых случаях секвенирование TCR vβ осуществляют путем глубокого секвенирования. В некоторых случаях длину теломер измеряют с применением TAT-анализа. В некоторых случаях активность теломеразы определяют с применением Q-TRAP. В некоторых случаях длину теломер измеряют с применением TAT-анализа. В некоторых случаях метаболит определяют с использованием анализатора метаболитов CEDEX.

[001912] Приведенные выше примеры представлены для того, чтобы полностью раскрыть и описать для специалистов в данной области техники принципы создания и использования вариантов реализации композиций, систем и способов согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема изобретения, заявленного авторами. Предполагается, что модификации описанных выше способов осуществления данного изобретения, очевидные для специалистов в данной области техники, находятся в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Все патенты и публикации, упомянутые в данном описании, указывают на уровень квалификации специалистов в области техники, к которой относится данное изобретение.

[001913] Все заголовки и обозначения разделов используются только для ясности и в справочных целях, и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие. Например, специалисты в данной области техники оценят полезность комбинирования различных аспектов данного раскрытия из разных заголовков и разделов, в зависимости от ситуации, в соответствии с сущностью и объемом изобретения, описанного в данном документе.

[001914] Все источники, процитированные в данном документе, тем самым

включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме и для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[001915] Многие модификации и вариации данной заявки могут быть выполнены без отклонения от ее сущности и объема, как будет очевидно для специалистов в данной области техники. Конкретные варианты реализации и примеры, описанные в настоящем документе, приведены исключительно в качестве примеров, и настоящее изобретение ограничено исключительно текстом прилагаемой формулы изобретения наряду с полным объемом эквивалентов, на которые распространяется формула изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) взятие и/или получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, взятого у указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(b) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем количество клеток в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(c) осуществление быстрого второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, причем число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раз больше числа АПК, добавленного на этапе (b), при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, при этом указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, причем указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область;

(d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c); и

(e) перенос собранной популяции TIL с этапа (d) в пакет для инфузии.

2. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

взятие и/или получение первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй

популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, причем указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c).

3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что на этапе (b) клеточная культуральная среда дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и при этом число АПК в культуральной среде на этапе (c) больше числа АПК в культуральной среде на этапе (b).

4. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL, причем указанная первая популяция TIL может быть получена путем переработки образца опухоли из опухоли, резецированной у субъекта, во множество фрагментов опухоли, в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно ОКТ-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL выше, чем в первой популяции TIL;

(b) осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с клеточной культуральной средой для второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, ОКТ-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК при быстром втором размножении по меньшей мере в два раза больше числа АПК на этапе (a), причем указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, при этом указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область; и

(c) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (b).

5. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно ОКТ-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое

размножение осуществляют на протяжении первого периода, составляющего приблизительно от 1 до 7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(b) осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 1-11 дней, с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

(c) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (b).

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что на этапе (a) клеточная культуральная среда дополнительно содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и при этом число АПК в культуральной среде на этапе (c) больше числа АПК в культуральной среде на этапе (b).

7. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 20:1.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 10:1.

9. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 5:1.

10. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2:1 до приблизительно 3:1.

11. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что отношение числа АПК при быстром втором размножении к количеству АПК при подготовительном первом размножении составляет приблизительно 2:1.

12. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно $1,0 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $4,5 \times 10^6$ АПК/см^2, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно $2,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $7,5 \times 10^6$ АПК/см^2.

13. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно $1,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $3,5 \times 10^6$ АПК/см^2, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно $3,5 \times 10^6$ АПК/см^2 до приблизительно $6,0 \times 10^6$ АПК/см^2.

14. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при

подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2,0 × 10^6 АПК/см^2 до приблизительно 3,0 × 10^6 АПК/см^2, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно 4,0 × 10^6 АПК/см^2 до приблизительно 5,5 × 10^6 АПК/см^2.

15. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 1 × 10^8 АПК до приблизительно 3,5 × 10^8 АПК, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно 3,5 × 10^8 АПК до приблизительно 1 × 10^9 АПК.

16. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 1,5 × 10^8 АПК до приблизительно 3 × 10^8 АПК, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно 4 × 10^8 АПК до приблизительно 7,5 × 10^8 АПК.

17. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что число АПК при подготовительном первом размножении находится в диапазоне от приблизительно 2 × 10^8 АПК до приблизительно 2,5 × 10^8 АПК, а число АПК при быстром втором размножении находится в диапазоне от приблизительно 4,5 × 10^8 АПК до приблизительно 5,5 × 10^8 АПК.

18. Способ по п. 1, или 3, или 6, отличающийся тем, что приблизительно 2,5 × 10^8 АПК добавляют при подготовительном первом размножении и 5 × 10^8 АПК добавляют при быстром втором размножении.

19. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет от приблизительно 1,5:1 до приблизительно 100:1.

20. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 50:1.

21. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 25:1.

22. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 20:1.

23. Способ по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что отношение числа TIL во второй популяции TIL к количеству TIL в первой популяции TIL составляет приблизительно 10:1.

24. Способ по любому из пп. 1-18, отличающийся тем, что число TIL в указанной второй популяции TIL по меньшей мере в 50 раз больше, чем в первой популяции TIL.

25. Способ по любому из пп. 2-6, отличающийся тем, что указанный способ включает проведение, после этапа сбора терапевтической популяции TIL, дополнительного этапа:

переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии.

26. Способ по любому из пп. 2-25, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов опухоли распределяют по множеству отдельных контейнеров, в каждом из которых вторую популяцию TIL получают из первой популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения, а третью популяцию TIL получают из второй популяции TIL на этапе быстрого второго размножения, при этом терапевтическую популяцию TIL, полученную из третьей популяции TIL, собирают из каждого контейнера из множества контейнеров и объединяют с получением собранной популяции TIL.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанное множество отдельных контейнеров содержит по меньшей мере два отдельных контейнера.

28. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до двадцати отдельных контейнеров.

29. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до десяти отдельных контейнеров.

30. Способ по п. 26, отличающийся тем, что указанное множество отдельных контейнеров содержит от двух до пяти отдельных контейнеров.

31. Способ по любому из пп. 26-30, причем каждый из указанных отдельных контейнеров содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

32. Способ по любому из пп. 2-25, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов опухоли распределяют в один контейнер.

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что указанный один контейнер содержит первую газопроницаемую поверхностную область.

34. Способ по п. 31 или 33, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоев клеток.

36. Способ по п. 33, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

37. Способ по любому из пп. 34-36, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область с толщиной от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

38. Способ по п. 37, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную

область с толщиной от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

39. Способ по п. 38, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

40. Способ по любому из пп. 2-25, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения указанное подготовительное первое размножение осуществляют в первом контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, и на этапе быстрого второго размножения указанное быстрое второе размножение осуществляют во втором контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область.

41. Способ по п. 40, отличающийся тем, что указанный второй контейнер больше первого контейнера.

42. Способ по п. 40 или 41, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

43. Способ по п. 41, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоя клеток.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

45. Способ по любому из пп. 40-44, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на вторую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

48. Способ по любому из пп. 2-39, отличающийся тем, что в каждом контейнера, в котором осуществляют подготовительное первое размножение первой популяции TIL, осуществляют также и быстрое второе размножение второй популяции TIL, полученной из такой первой популяции TIL.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что каждый контейнер содержит первую

газопроницаемую поверхностную область.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и указанные АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно одного слоя клеток до приблизительно трех слоев клеток.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 1,5 слоев клеток до приблизительно 2,5 слоев клеток.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 2 слоя клеток.

53. Способ по любому из пп. 49-52, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 3 слоев клеток до приблизительно 5 слоев клеток.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине от приблизительно 3,5 слоев клеток до приблизительно 4,5 слоев клеток.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область при средней толщине, составляющей приблизительно 4 слоя клеток.

56. Способ по любому из пп. 2-32, 40, 41 и 48, отличающийся тем, что для каждого контейнера, в котором осуществляют подготовительное первое размножение первой популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения, указанный первый контейнер содержит первую поверхностную область, клеточная культуральная среда содержит антигенпрезентирующие клетки (АПК), и АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхностную область, при этом отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,1 до приблизительно 1:10.

57. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,2 до приблизительно 1:8.

58. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему

количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,3 до приблизительно 1:7.

59. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,4 до приблизительно 1:6.

60. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,5 до приблизительно 1:5.

61. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,6 до приблизительно 1:4.

62. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,7 до приблизительно 1:3,5.

63. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,8 до приблизительно 1:3.

64. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, находится в диапазоне от приблизительно 1:1,9 до приблизительно 1:2,5.

65. Способ по п. 56, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на этапе подготовительного первого размножения, к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на этапе быстрого второго размножения, составляет приблизительно 1:2.

66. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что через 2-3 дня на этапе быстрого второго размножения в клеточную культуральную среду добавляют дополнительный ИЛ-2.

67. Способ по любому из предыдущих пунктов, дополнительно включающий криоконсервацию собранной популяции TIL на этапе сбора терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации.

68. Способ по п. 1 или 25, дополнительно включающий этап криоконсервации пакета для инфузии.

69. Способ по п. 67 или 68, отличающийся тем, что указанный процесс криоконсервации осуществляют с использованием отношения 1:1 собранной популяции

TIL к среде для криоконсервации.

70. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

71. Способ по п. 70, отличающийся тем, что указанные МКПК являются облученными и аллогенными.

72. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что на этапе подготовительного первого размножения клеточная культуральная среда содержит мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), и при этом общее количество МКПК добавленных в клеточную культуральную среду на этапе подготовительного первого размножения составляет приблизительно $2,5 \times 10^8$.

73. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что на этапе быстрого второго размножения антигенпрезентирующие клетки (АПК) в клеточной культуральной среде представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), и при этом общее количество МКПК, добавленных в клеточную культуральную среду на этапе быстрого второго размножения, составляет приблизительно 5×10^8.

74. Способ по любому из пп. 1-66, отличающийся тем, что указанные антигенпрезентирующие клетки представляют собой искусственные антигенпрезентирующие клетки.

75. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL осуществляют с применением мембранной системы обработки клеток.

76. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что сбор на этапе сбора терапевтической популяции TIL осуществляют с применением системы обработки клеток LOVO.

77. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов содержит приблизительно 60 фрагментов на контейнер на этапе подготовительного первого размножения, причем каждый фрагмент имеет объем, составляющий приблизительно 27 $мм^3$.

78. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов содержит приблизительно 30 до приблизительно 60 фрагментов с общим объемом, составляющим от приблизительно 1300 $мм^3$ до приблизительно 1500 $мм^3$.

79. Способ по п. 78, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общим объемом, составляющим приблизительно 1350 $мм^3$.

80. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанное множество фрагментов содержит приблизительно 50 фрагментов с общей массой, составляющей от приблизительно 1 грамма до приблизительно 1,5 граммов.

81. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что указанная

клеточная культуральная среда находится в контейнере, выбранном из группы, состоящей из G-контейнера и мешка для культур клеток Xuri.

82. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что концентрация ИЛ-2 составляет от приблизительно 10 000 МЕ/мл до приблизительно 5000 МЕ/мл.

83. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что концентрация ИЛ-2 составляет приблизительно 6000 МЕ/мл.

84. Способ по п. 1 или 25, отличающийся тем, что указанный пакет для инфузии на этапе переноса собранной терапевтической популяции TIL в пакет для инфузии представляет собой содержащий HypoThermosol пакет для инфузии.

85. Способ по любому из пп. 67-69, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит диметилсульфоксид (ДМСО).

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что среда для криоконсервации содержит 7% - 10% ДМСО.

87. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый из периодов, первый период на этапе подготовительного первого размножения и второй период на этапе быстрого второго размножения, осуществляют индивидуально в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

88. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что указанный первый период на этапе подготовительного первого размножения осуществляют в течение периода 5 дней, 6 дней или 7 дней.

89. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что указанный второй период на этапе быстрого второго размножения осуществляют в течение периода 7 дней, 8 дней или 9 дней.

90. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что каждый из периодов, первый период на этапе подготовительного первого размножения и второй период на этапе быстрого второго размножения, осуществляют индивидуально в течение периода 7 дней.

91. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в течение периода от приблизительно 14 дней до приблизительно 16 дней.

92. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в течение периода от приблизительно 15 дней до приблизительно 16 дней.

93. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в течение периода, составляющего приблизительно 14 дней.

94. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в течение периода, составляющего приблизительно 15 дней.

95. Способ по любому из пп. 1-86, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL осуществляют в течение периода, составляющего приблизительно 16 дней.

96. Способ по любому из пп. 1-86, который дополнительно включает этап криоконсервации собранной терапевтической популяции TIL с использованием процесса криоконсервации, отличающийся тем, что этапы от подготовительного первого размножения до сбора терапевтической популяции TIL и криоконсервации осуществляют за 16 дней или менее.

97. Способ по любому из пп. 1-93, отличающийся тем, что терапевтическая популяция TIL, собранная на этапе сбора терапевтической популяции TIL, содержит достаточно TIL для терапевтически эффективной дозировки указанных TIL.

98. Способ по п. 97, отличающийся тем, что указанное число TIL, достаточное для терапевтически эффективной дозировки, составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

99. Способ по любому из пп. 1-98, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе быстрого второго размножения обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

100. Способ по любому из пп. 1-98, отличающийся тем, что третья популяция TIL на этапе быстрого второго размножения обеспечивает повышенное по меньшей мере в 1-5 раз или более продуцирование интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 18 дней.

101. Способ по любому из пп. 1-98, отличающийся тем, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, полученные из указанной третьей популяции TIL на этапе быстрого второго размножения, демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, полученных из указанной второй популяции TIL на этапе подготовительного первого размножения.

102. Способ по любому из пп. 1-101, отличающийся тем, что указанную терапевтическую популяцию TIL с этапа сбора терапевтической популяции TIL вводят пациенту путем инфузии.

103. Способ лечения субъекта с раком, отличающийся тем, что указанный способ включает введение размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающий:

(a) получение и/или взятие первой популяции TIL из опухоли, резецированной у субъекта, путем разделения образца опухоли, полученного от указанного субъекта, на множество фрагментов опухоли;

(b) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL в клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, необязательно OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, причем подготовительное первое размножение

осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение приблизительно 1-7/8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL по меньшей мере в 50 раз больше, чем в первой популяции TIL;

(c) осуществление быстрого второго размножения путем добавления в клеточную культуральную среду второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раза больше числа АПК, добавленного на этапе (b), причем быстрое второе размножение осуществляют в течение приблизительно 1-11 дней с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяции TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, при этом быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область;

(d) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (c);

(e) перенос собранной популяции TIL с этапа (d) в пакет для инфузии; и

(f) введение терапевтически эффективной дозировки TIL с этапа (e) указанному субъекту.

104. Способ по п. 103, отличающийся тем, что число TIL, достаточное для введения терапевтически эффективной дозировки на этапе (f), составляет от приблизительно $2,3\times10^{10}$ до приблизительно $13,7\times10^{10}$.

105. Способ по п. 103, отличающийся тем, что указанные антигенпрезентирующие клетки (АПК) представляют собой МКПК.

106. Способ по любому из пп. 103-105, отличающийся тем, что перед введением терапевтически эффективной дозировки клеток TIL на этапе (f) у указанного пациента использовали схему немиелоаблативной лимфодеплеции.

107. Способ по п. 106, отличающийся тем, что указанная схема немиелоаблативной лимфодеплеции включает этапы введения циклофосфамида в дозе, составляющей 60 мг/м^2/сутки в течение двух дней, и последующего введения флударабина в дозе, составляющей 25 мг/м^2/сутки, в течение пяти дней.

108. Способ по любому из пп. 103-107, который дополнительно включает этап лечения указанного пациента по схеме с высокими дозами ИЛ-2, начиная со следующего дня после введения клеток TIL указанному пациенту на этапе (f).

109. Способ по п. 108, отличающийся тем, что указанная схема с высокими дозами ИЛ-2 включает введение 600 000 или 720 000 МЕ/кг в виде 15-минутной болюсной внутривенной инфузии каждые восемь часов до толерантности.

110. Способ по любому из пп. 103-109, отличающийся тем, что указанная третья популяция TIL на этапе (b) обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

111. Способ по любому из пп. 103-109, отличающийся тем, что указанная третья

популяции TIL на этапе (c) обеспечивает повышение продуцирования интерферона гамма по меньшей мере в 1-5 раз или более по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

112. Способ по любому из пп. 103-109, отличающийся тем, что эффекторные Т-клетки и/или Т-клетки центральной памяти, взятые из третьей популяции TIL на этапе (c), демонстрируют повышенную экспрессию CD8 и CD28 относительно эффекторных Т-клеток и/или Т-клеток центральной памяти, взятых из второй популяции клеток на этапе (b).

113. Способ по любому из пп. 103-112, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

114. Способ по любому из пп. 103-112, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

115. Способ по п. 114, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

116. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой меланому.

117. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

118. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

119. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

120. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

121. Способ по п. 115, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

122. Способ по любому из пп. 103-121, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

123. Способ по любому из пп. 103-121, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

124. Способ по любому из пп. 103-123, отличающийся тем, что указанный контейнер представляет собой закрытый контейнер.

125. Способ по любому из пп. 103-124, отличающийся тем, что указанный контейнер представляет собой G-контейнер.

126. Способ по любому из пп. 103-125, отличающийся тем, что указанный

контейнер представляет собой GREX-10.

127. Способ по любому из пп. 103-125, отличающийся тем, что указанный закрытый контейнер включает GREX-100.

128. Способ по любому из пп. 103-125, отличающийся тем, что указанный закрытый контейнер включает GREX-500.

129. Терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная способом по любому из предыдущих пунктов.

130. Терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), полученная из ткани опухоли пациента, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL обеспечивает повышенную эффективность, повышенное продуцирование интерферона-гамма и/или повышенную поликлональность.

131. Терапевтическая популяция TIL по п. 129 или п. 130, которая обеспечивает повышенное продуцирование интерферона-гамма.

132. Терапевтическая популяция TIL по п. 129 или п. 130, которая обеспечивает повышенную поликлональность.

133. Терапевтическая популяция TIL по п. 129 или п. 130, которая обеспечивает повышенную эффективность.

134. Терапевтическая популяция TIL по любому из пп. 129-133, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

135. Терапевтическая популяция TIL по любому из пп. 129-133, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

136. Терапевтическая популяция TIL по любому из пп. 129-133, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса продолжительностью более 16 дней.

137. Терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК).

138. Терапевтическая популяция TIL по п. 137, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК.

139. Терапевтическая популяция TIL по п. 138, отличающаяся тем, что указанная

терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления АПК.

140. Терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления ОКТ3.

141. Терапевтическая популяция TIL по п. 140, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления ОКТ3.

142. Терапевтическая популяция TIL по п. 140, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют вообще без добавления ОКТ3.

143. Терапевтическая популяция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в один раз больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления ОКТ3.

144. Терапевтическая популяция TIL по п. 143, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в два раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления ОКТ3.

145. Терапевтическая популяция TIL по п. 143, отличающаяся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL способна продуцировать по меньшей мере в три раза больше интерферона-гамма по сравнению с TIL, полученными с использованием процесса, при котором первое размножение TIL осуществляют без добавления антигенпрезентирующих клеток (АПК) и без добавления ОКТ3.

146. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL по любому из пп. 126-145 и фармацевтически приемлемый носитель.

147. Стерильный пакет для инфузии, содержащий композицию TIL по п. 143.

148. криоконсервированный препарат с терапевтической популяцией TIL по

любому из пп. 129-142.

149. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), содержащая терапевтическую популяцию TIL по любому из пп. 129-145 и среду для криоконсервации.

150. Композиция TIL по п. 149, отличающаяся тем, что среда для криоконсервации содержит ДМСО.

151. Композиция TIL по п. 150, отличающаяся тем, что среда для криоконсервации содержит 7-10% ДМСО.

152. криоконсервированный препарат с композицией TIL по любому из пп. 146-151.

153. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 для применения в качестве медикамента.

154. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака.

155. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака с солидной опухолью.

156. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, выбранного из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

157. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, выбранного из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

158. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что рак представляет собой меланому.

159. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что рак представляет собой ПКРГШ.

160. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что рак представляет собой рак шейки матки.

161. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

162. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

163. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

164. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

165. Композиция TIL по любому из пп. 146-152 для применения в лечении рака, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

166. Применение композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 146-152 в способе лечения рака у субъекта, включающее введение терапевтически эффективной дозировки композиции TIL указанному субъекту.

167. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

168. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

169. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

170. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой меланому.

171. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

172. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

173. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

174. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

175. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

176. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

177. Применение композиции TIL по п. 166, отличающееся тем, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

178. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 143-152 для применения в способе лечения рака у субъекта, включающем введение терапевтически эффективной дозировки композиции TIL указанному субъекту.

179. Композиция TIL по п. 178, отличающаяся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

180. Композиция TIL по п. 178, отличающаяся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

181. Композиция TIL по п. 178, отличающаяся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

182. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту терапевтически эффективная дозировки композиции инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) по любому из пп. 143-152.

183. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой солидную опухоль.

184. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака яичников, рака шейки матки, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ), рака легкого, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака, вызванного папилломавирусом человека, рака головы и шеи (в том числе плоскоклеточной карциномы головы и шеи (ПКРГШ)), глиобластомы (в том числе GBM), рака желудочно-кишечного тракта, рака почек и почечноклеточного рака.

185. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, ПКРГШ, рака шейки матки, НМРЛ, глиобластомы (в том числе GBM) и рака желудочно-кишечного тракта.

186. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой меланому.

187. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой ПКРГШ.

188. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак шейки матки.

189. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой НМРЛ.

190. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой глиобластому (в том числе GBM).

191. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой рак желудочно-кишечного тракта.

192. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой гипермутированный рак.

193. Способ по п. 182, отличающийся тем, что указанный рак представляет собой педиатрический гипермутированный рак.

194. Способ размножения Т-клеток, включающий:

(a) осуществление подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток, взятой от донора, путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для подготовки активации первой популяции Т-клеток;

(b) после того как активация первой популяции Т-клеток, подготовленной на этапе (a), начинает ослабевать, осуществление быстрого второго размножения первой популяции Т-клеток путем культивирования первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и для стимуляции активации первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и

(c) сбор второй популяции Т-клеток.

195. Способ по п. 194, отличающийся тем, что подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью до 7 дней.

196. Способ по п. 194 или 195, отличающийся тем, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 11 дней.

197. Способ по п. 196, отличающийся тем, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 9 дней.

198. Способ по любому из пп. 194-197, отличающийся тем, что подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 7 дней, а быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью 9 дней.

199. Способ по п. 194, отличающийся тем, что указанное подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

200. Способ по п. 194 или 195, отличающийся тем, что быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью до 8 дней.

201. Способ по любому из пп. 194-197, отличающийся тем, что подготовительное первое размножение согласно этапу (a) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней, а быстрое второе размножение согласно этапу (b) осуществляют в течение периода продолжительностью 8 дней.

202. Способ по любому из пп. 194-201, отличающийся тем, что на этапе (a) первую популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде, содержащей ОКТ-3 и ИЛ-2.

203. Способ по п. 202, отличающийся тем, что указанная первая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

204. Способ по любому из пп. 194-201, отличающийся тем, что на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде, содержащей ОКТ-3, ИЛ-2 и антигенпрезентирующие клетки (АПК).

205. Способ по любому из пп. 194-201, отличающийся тем, что на этапе (a) первую

популяцию Т-клеток культивируют в первой культуральной среде в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхность, при этом указанная первая культуральная среда необязательно содержит ОКТ-3, ИЛ-2 и необязательно первую популяцию антигенпрезентирующих клеток (АПК), отличающуюся тем, что указанная первая популяция АПК является экзогенной для донора первой популяции Т-клеток и указанная первая популяция АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхность, при этом на этапе (b) первую популяцию Т-клеток культивируют во второй культуральной среде в указанном контейнере, при этом указанная вторая культуральная среда содержит ОКТ-3, ИЛ-2, и вторую популяцию АПК, отличающуюся тем, что указанная вторая популяция АПК является экзогенной для донора первой популяции Т-клеток и указанная вторая популяция АПК наслаивают на указанную первую газопроницаемую поверхность, причем указанная вторая популяция АПК больше первой популяции АПК.

206. Способ по п. 205, отличающийся тем, что отношение числа АПК во второй популяции АПК к количеству АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно 2:1.

207. Способ по п. 205 или 206, при этом число АПК в первой популяции АПК составляет приблизительно $2,5\times10^8$ и число АПК во второй популяции АПК составляет приблизительно 5×10^8.

208. Способ по любому из пп. 205-207, отличающийся тем, что на этапе (a) первую популяцию АПК наносят слоем на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине 2 слоя АПК.

209. Способ по любому из пп. 205-208, отличающийся тем, что на этапе (b) вторую популяцию АПК наносят слоем на первую газопроницаемую поверхность при средней толщине в диапазоне от 4 до 8 слоев АПК.

210. Способ по любому из пп. 205-209, отличающийся тем, что отношение среднего количества слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (b), к среднему количеству слоев АПК, которые наслаивают на первую газопроницаемую поверхность на этапе (a), составляет 2:1.

211. Способ по любому из пп. 205-210, отличающийся тем, что указанные АПК представляют собой мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК).

212. Способ по любому из пп. 205-211, отличающийся тем, что АПК содержат МКПК, облученные и экзогенные для донора первой популяции Т-клеток.

213. Способ по любому из пп. 202-209, отличающийся тем, что указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие опухоль лимфоциты (TIL).

214. Способ по любому из пп. 202-209, отличающийся тем, что указанные Т-клетки представляют собой инфильтрирующие костный мозг лимфоциты (MIL).

215. Способ по любому из пп. 202-209, отличающийся тем, что указанные Т-клетки представляют собой лимфоциты периферической крови (ЛПК).

216. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что клеточная

культуральная среда представляет собой среду с определенным составом и/или бессывороточную среду.

217. Способ по п. 216, отличающийся тем, что среда с определенным составом содержит (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

218. Способ по любому из пп. 216-217, отличающийся тем, что указанная бессывороточная или среда с определенным составом содержит базальную клеточную культуральную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки.

219. Способ по п. 218, отличающийся тем, что базальная среда для культивирования клеток выбрана из группы, состоящей из базальной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ T-cell Expansion Basal Medium, бессывороточной среды для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ T-Cell Expansion SFM, среды CTS™ AIM-V, бессывороточной среды CTS™ AIM-V SFM, не содержащей инородных компонентов среды для размножения Т-клеток LymphoONE™ T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, среды Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), минимальной питательней среды (MEM), базальной среды Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальной питательней среды (αMEM), минимальной питательной среды Глазго (G-MEM), ростовой среды RPMI и модифицированной Исковым среды Дульбекко.

220. Способ по любому из пп. 218-219, отличающийся тем, что указанные сывороточная добавка или заменитель сыворотки выбраны из группы, состоящей из сывороточной добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer и заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

221. Способ по любому из пп. 216-220, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит один или более альбуминов или заменителей альбумина.

222. Способ по любому из пп. 216-221, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит одну или более аминокислот.

223. Способ по любому из пп. 216-222, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов.

224. Способ по любому из пп. 216-223, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов.

225. Способ по любому из пп. 216-224, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов.

226. Способ по любому из пп. 216-225, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит альбумин.

227. Способ по любому из пп. 216-226, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-

фенилаланина, L-пролина, L- гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}.

228. Способ по любому из пп. 216-227, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

229. Способ по любому из пп. 216-228, отличающийся тем, что общая концентрация заменителя сыворотки в клеточной культуральной среде составляет (% об.) от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от клеточной культуральной среды.

230. Способ по любому из пп. 216-229, отличающийся тем, что общая концентрация заменителя сыворотки в клеточной культуральной среде составляет приблизительно 3%, приблизительно 5%, или приблизительно 10% от общего объема клеточной культуральной среды.

231. Способ по любому из пп. 216-230, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мыМ или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ.

232. Способ по любому из пп. 216-231, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2 мМ.

233. Способ по любому из пп. 216-232, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ или приблизительно 65 мМ.

234. Способ по любому из пп. 216-233, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

235. Способ по любому из пп. 216-234, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит среду с определенным составом, описанную в международной PCT-публикации WO/1998/030679.

236. Способ по любому из пп. 216-235, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит количество глицина в диапазоне приблизительно 5-200

мг/л, L-гистидина в диапазоне приблизительно 5-250 мг/л, L-изолейцина в диапазоне приблизительно 5-300 мг/л, L-метионина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-фенилаланина в диапазоне приблизительно 5-400 мг/л, L-пролина в диапазоне приблизительно 1-1000 мг/л, L-гидроксипролина в диапазоне приблизительно 1-45 мг/л, L-серина в диапазоне приблизительно 1-250 мг/л, L-треонина в диапазоне приблизительно 10-500 мг/л, L-триптофана в диапазоне приблизительно 2-110 мг/л, L-тирозина в диапазоне приблизительно 3-175 мг/л, L-валина в диапазоне приблизительно 5-500 мг/л, тиамина в диапазоне от приблизительно 1-20 мг/л, восстановленного глутатиона в диапазоне от приблизительно 1-20 мг/л, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата в диапазоне приблизительно 1-200 мг/л, насыщенный железом трансферрина в диапазоне от приблизительно 1-50 мг/л, инсулина в диапазоне от приблизительно 1-100 мг/л, селенита натрия в диапазоне от приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л и/или альбумина (например, AlbuMAX® I) в диапазоне от приблизительно 5000-50 000 мг/л.

237. Способ по любому из пп. 216-236, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит один или более ингредиентов, не содержащих следовых элементов в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в 1X среде» в таблице A настоящего документа.

238. Способ по любому из пп. 216-237, отличающийся тем, что осмолярность клеточной культуральной среды составляет приблизительно от 260 до 350 мОсмоль.

239. Способ по любому из пп. 216-238, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия.

240. Способ по любому из пп. 216-239, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда дополнительно содержит L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ) и/или 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

241. Способ по любому из пп. 216-240, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известен как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

242. Способ по любому из пп. 216-240, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS OpTmizer T-Cell Expansion SFM, 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS, 55 мМ BME и необязательно глутамин.

243. Способ по любому из пп. 216-240, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ и 2 мМ Glutamax, необязательно дополнительно содержащую 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

244. Способ по любому из пп. 216-240, отличающийся тем, что клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, 2 мМ Glutamax, и необязательно дополнительно содержащую 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

245. Способ по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что образец опухоли представляет собой что-либо одно или более из продуктов малой биопсии, трепанобиоптатов, или продуктов игольной биопсии опухоли у указанного субъекта.

246. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(i) взятие и/или получение первой популяции TIL из образца опухоли, полученного из одного или более продуктов малой биопсии, трепанобиоптатов или продуктов игольной биопсии опухоли у субъекта путем культивирования указанного образца опухоли в первой клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, в течение приблизительно 3 дней;

(ii) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL во второй клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют в контейнере, содержащем первую газопроницаемую поверхностную область, причем указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение первого периода, составляющего приблизительно 7 или 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(iii) осуществление быстрого второго размножения путем добавления во вторую клеточную культуральную среду второй популяции TIL с дополнительными ИЛ-2, OKT-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом число АПК, добавленное при быстром втором размножении, по меньшей мере в два раза больше числа АПК, добавленного на этапе (ii), при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 11 дней, с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в контейнере, содержащем вторую газопроницаемую поверхностную область;

(iv) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (iii); и

(v) перенос собранной популяции TIL с этапа (iv) в пакет для инфузии.

247. Способ размножения инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) в терапевтическую популяцию TIL, включающий:

(i) взятие и/или получение первой популяции TIL из образца опухоли, полученного из одного или более продуктов малой биопсии, трепанобиоптатов или продуктов

игольной биопсии опухоли у субъекта путем культивирования указанного образца опухоли в первой клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, в течение приблизительно 3 дней;

(ii) осуществление подготовительного первого размножения путем культивирования первой популяции TIL во второй клеточной культуральной среде, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и антигенпрезентирующие клетки (АПК), с получением второй популяции TIL, при этом указанное подготовительное первое размножение осуществляют в течение первого периода, составляющего приблизительно 7 или 8 дней, с получением второй популяции TIL, причем число TIL в указанной второй популяции TIL больше, чем в первой популяции TIL;

(iii) осуществление быстрого второго размножения путем приведения в контакт второй популяции TIL с третьей клеточной культуральной средой, содержащей ИЛ-2, ОКТ-3 и АПК, с получением третьей популяции TIL, при этом указанное быстрое второе размножение осуществляют в течение второго периода, составляющего приблизительно 11 дней, с получением третьей популяции TIL, отличающейся тем, что указанная третья популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL; и

(iv) сбор терапевтической популяции TIL, полученной на этапе (iii).

248. Способ по 246 или 247, отличающийся тем, что после дня 5 второго периода культуру разделяют на 2 или более субкультур, и в каждую субкультуру добавляют дополнительное количество третьей культуральной среды и культивируют в течение приблизительно 6 дней.

249. Способ по п. 248, отличающийся тем, что после дня 5 второго периода культуру разделяют на субкультуры, получая до 5 субкультур.

250. Способ по любому из пп. 246-249, отличающийся тем, что все этапы способа завершают приблизительно за 22 дня.

251. Способ размножения Т-клеток, включающий:

(i) осуществление подготовительного первого размножения первой популяции Т-клеток из образца опухоли, полученной из одного или более продуктов малой биопсии, трепанобиоптатов или продуктов игольной биопсии опухоли у донора путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток для обеспечения роста и подготовки активации первой популяции Т-клеток;

(ii) после того, как активация первой популяции Т-клеток, подготовленных на этапе (a), начинает ослабевать, осуществление быстрого второго размножения первой популяции Т-клеток путем культивирования указанной первой популяции Т-клеток для стимуляции роста и дополнительной активации первой популяции Т-клеток с получением второй популяции Т-клеток; и

(iv) сбор второй популяции Т-клеток.

252. Способ по любому из пп. 245-251, отличающийся тем, что указанный образец опухоли получают из множества трепанобиоптатов.

253. Способ по п. 252 отличающийся тем, что указанное множество

трепанобиоптатов выбрана из группы, состоящей из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 трепанобиоптатов.

254. Композиция инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL) или размноженных инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), включающая:

i) популяцию инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (TIL), и

ii) среду с определенным составом или бессывороточную среду, необязательно содержащие (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

255. Композиция TIL или размноженных TIL по п. 245, отличающиеся тем, что указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит (необязательно рекомбинантный) трансферрин, (необязательно рекомбинантный) инсулин и (необязательно рекомбинантный) альбумин.

256. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 245-246, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит базальную клеточную среду и сывороточную добавку и/или заменитель сыворотки.

257. Композиция TIL или расширенного TIL по п. 247, отличающаяся тем, что базальная клеточная среда включает, но не ограничивается ими, базальную среду для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, SFM для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™, среду CTS™ AIM-V, CTS™ AIM-V SFM, среда LymphoONE™, не содержащая ксено для увеличения Т-клеток, среда Игла, модифицированная Дульбекко (DMEM), минимальная необходимая среда (MEM), базальную среду Игла (BME), RPMI 1640, F-10, F-12, минимальную питательную среду (αMEM), минимальная питательная среда Глазго (G-MEM), питательная среда RPMI и модифицированная среда Дульбекко Искова.

258. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 256-257, отличающиеся тем, что указанные сывороточная добавка или заменитель сыворотки выбраны из группы, состоящей из сывороточной добавки для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer и заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™.

259. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-258, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более альбуминов или заменителей альбумина.

260. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-259, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит одну или более аминокислот.

261. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-260, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более витаминов, один или более трансферринов или заменителей трансферринов.

262. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-261,

отличающийся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более антиоксидантов, один или более инсулинов или заменителей инсулинов.

263. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-262, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более предшественников коллагена, один или более антибиотиков, и один или более следовых элементов.

264. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-263, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит альбумин.

265. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-264, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит альбумин и один или более ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из глицина, L- гистидина, L-изолейцина, L-метионина, L-фенилаланина, L-пролина, L-гидроксипролина, L-серина, L-треонина, L-триптофана, L-тирозина, L-валина, тиамина, восстановленного глутатиона, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата, насыщенного железом трансферрина, инсулина и соединений, содержащих следовые элементы Ag^{+}, Al^{3+}, Ba^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cr^{3+}, Ge^{4+}, Se^{4+}, Br, T, Mn^{2+}, P, Si^{4+}, V^{5+}, Mo^{6+}, Ni^{2+}, Rb^{+}, Sn^{2+} и Zr^{4+}.

266. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-265, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит L-глутамин, бикарбонат натрия и/или 2-меркаптоэтанол.

267. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-266, отличающиеся тем, что общая концентрация заменителя сыворотки в среде с определенным составом или бессывороточной среде составляет (% об.) от приблизительно 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% по объему от клеточной культуральной среды.

268. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-267, отличающиеся тем, что общая концентрация заменителя сыворотки в среде с определенным составом или бессывороточной среде составляет приблизительно 3%, приблизительно 5% или приблизительно 10% от общего объема клеточной культуральной среды.

269. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-268, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 10 мМ, от 0,5 мМ до приблизительно 9 мМ, от 1 мМ до приблизительно 8 мМ, от 2 мМ до приблизительно 7 мМ, от 3 мМ до приблизительно 6 мМ; или от 4 мМ до приблизительно 5 мМ.

270. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-269, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит глутамин (т.е. GlutaMAX®) в концентрации приблизительно 2

мМ.

271. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-270, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации от приблизительно 5 мМ до приблизительно 150 мМ, от 10 мМ до приблизительно 140 мМ, от 15 мМ до приблизительно 130 мМ, от 20 мМ до приблизительно 120 мМ, от 25 мМ до приблизительно 110 мМ, от 30 мМ до приблизительно 100 мМ, от 35 мМ до приблизительно 95 мМ, от 40 мМ до приблизительно 90 мМ, от 45 мМ до приблизительно 85 мМ, от 50 мМ до приблизительно 80 мМ, от 55 мМ до приблизительно 75 мМ, от 60 мМ до приблизительно 70 мМ, или приблизительно 65 мМ.

272. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-271, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит 2-меркаптоэтанол в концентрации приблизительно 55 мМ.

273. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-272, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит среду с определенным составом, описанную в международной PCT-публикации WO/1998/030679.

274. Композиция TIL или размноженных TILпо любому из пп. 254-273, отличающиеся тем, что указанная среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит количество глицина в диапазо не приблизительно 5-200 мг/л, L- гистидина в диапазоне приблизительно 5-250 мг/л, L-изолейцина в диапазоне приблизительно 5-300 мг/л, L-метионина в диапазоне приблизительно 5-200 мг/л, L-фенилаланина в диапазоне приблизительно 5-400 мг/л, L-пролина в диапазоне приблизительно 1-1000 мг/л, L-гидроксипролина в диапазоне приблизительно 1-45 мг/л, L-серина в диапазоне приблизительно 1-250 мг/л, L-треонина в диапазоне приблизительно 10-500 мг/л, L-триптофана в диапазоне приблизительно 2-110 мг/л, L-тирозина в диапазоне приблизительно 3-175 мг/л, L-валина в диапазоне приблизительно 5-500 мг/л, тиамина в диапазоне приблизительно 1-20 мг/л, восстановленного глутатиона в диапазоне от приблизительно 1-20 мг/л, L-аскорбиновая кислота-2-фосфата в диапазоне приблизительно 1-200 мг/л, насыщенного железом трансферрина в диапазоне от приблизительно 1-50 мг/л, инсулина в диапазоне от приблизительно 1-100 мг/л, селенита натрия в диапазоне от приблизительно 0,000001-0,0001 мг/л и/или альбумина (например, AlbuMAX® I) в диапазоне от приблизительно 5000-50 000 мг/л.

275. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-274, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда содержит один или более ингредиентов, не содержащих следовых элементов в диапазонах концентраций, указанных в столбце, обозначенном как «диапазон концентраций в 1X среде» в таблице A настоящего документа.

276. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-275, отличающиеся тем, что осмолярность среды с определенным составом или

бессывороточной среды составляет приблизительно от 260 до 350 мОсмоль.

277. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-276, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит приблизительно 3,7 г/л или приблизительно 2,2 г/л бикарбоната натрия.

278. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-277, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда дополнительно содержит L-глутамин (конечная концентрация - приблизительно 2 мМ), один или более антибиотиков, заменимые аминокислоты (NEAA; конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ) и/или 2-меркаптоэтанол (конечная концентрация - приблизительно 100 мкМ).

279. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-278, отличающиеся тем, что среда с определенным составом или бессывороточная среда в первом и/или втором газопроницаемом контейнере не содержит бета-меркаптоэтанола (BME или βME; также известен как 2-меркаптоэтанол, CAS 60-24-2).

280. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-279, отличающиеся тем, что указанная клеточная культуральная среда содержит бессывороточную среду для размножения Т-клеток CTS OpTmizer, 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS, 55 мМ BME и необязательно глутамин.

281. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-280, отличающиеся тем, что клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™ и 2 мМ Glutamax, необязательно дополнительно содержащую 6000 МЕ/мл ИЛ-2.

282. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-280, отличающиеся тем, что клеточная культуральная среда содержит базальную среду для размножения Т-клеток CTS™OpTmizer™, дополненную добавкой для размножения Т-клеток CTS™ OpTmizer™ (26 мл/л), с 3% заменителя сыворотки для иммунных клеток CTS™, 2 мМ Glutamax, и необязательно дополнительно содержит 3000 МЕ/мл ИЛ-2.

283. Композиция TIL или размноженных TIL по любому из пп. 254-282, отличающиеся тем, что указанная популяция TIL представляет собой терапевтическую популяцию TIL.

284. Композиция TIL или размноженных TILпо любому из пп. 254-283, отличающиеся тем, что указанная терапевтическая популяция TIL демонстрирует подъем уровня ИФН-γ в сыворотке, причем указанный подъем уровня ИФН-γ превышает 200 пг/мл, превышает 250 пг/мл, превышает 300 пг/мл, превышает 350 пг/мл, превышает 400 пг/мл, превышает 450 пг/мл, превышает 500 пг/мл, превышает 550 пг/мл, превышает 600 пг/мл, превышает 650 пг/мл, превышает 700 пг/мл, превышает 750 пг/мл, превышает 800 пг/мл, превышает 850 пг/мл, превышает 900 пг/мл, превышает 950 пг/мл или превышает 1000 пг/мл.

По доверенности

Способ 2A: около 22 дней после этапов A-E	Способ GEN 3: около 14-18 дней после этапов A-E
ЭТАП A Получение образца опухоли пациента (необязательное замораживание перед этапом B; необязательно образец опухоли получен путем трепанобиопсии/малой биопсии)	**ЭТАП A** Получение образца опухоли пациента (необязательное замораживание перед этапом B)
ЭТАП B Первое размножение (физическая фрагментация с получением по меньшей мере по 40 фрагментов на контейнер с культивированием в течение примерно 3-14 дней со средой, содержащей ИЛ-2)	**ЭТАП B** (Подготовительное первое размножение физическая фрагментация с получением до 60 фрагментов на контейнер с культивированием в течение примерно 1-7/8 дней со средой, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие фидерные клетки)
ЭТАП C Переход от первого размножения к второму размножению (С этапа B TIL непосредственно переводят на этап D, необязательно на 11 день этапа B)	**ЭТАП C** Переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению (С этапа B TIL непосредственно переводят на этап D на 7/8 день)
ЭТАП D Второе размножение (TIL, культивированные в ростовой среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки в закрытом контейнере)	**ЭТАП D** Быстрое второе размножение (TIL, культивированные в ростовой среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и 2x антигенпрезентирующих фидерных клеток; На 10-11 дни масштабирование и добавление дополнительного ИЛ-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D (TIL, собранные из закрытой системы)	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Получение итогового состава и/или перенос в пакет для инфузии (с необязательной криоконсервацией)	**ЭТАП F** Получение итогового состава и/или перенос в пакет для инфузии (с необязательной криоконсервацией)

Фиг. 1A

Процесс GEN 3: примерно 14-18 дней от этапов A-E

ЭТАП A
Получение образца опухоли пациента
(необязательно может быть заморожен до этапа B)

ЭТАП B
Подготовительное первое размножение
(физическая фрагментация, до 60 фрагментов на контейнер, культивирование от ≈1 дня до 7/8 дней в среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3 и необязательно антигенпрезентирующие фидерные клетки)

ЭТАП C
Переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму размножению (TIL с этапа B переводят прямо на этап D на 7/8 день)

ЭТАП D
Быстрое второе размножение
(TIL, культивированные в ростовой среде, содержащейИЛ-2, OKT-3 и 2X антиген-презентирующих фидерных клеток; Дни 10-11:масштабирование и добавление дополнительного ИЛ-2)

ЭТАП E
Сбор TIL с этапа D

ЭТАП F
Получение итогового состава и/или перенос в пакет для инфузии
(с необязательной криоконсервацией)

Фиг. 1B

Вариант реализации GEN 3.0: около 14-18 дней от этапов A-E	**Вариант реализации GEN 3.1 контроль ≈ 14-18 дней от этапов A - E**	**Вариант реализации GEN 3.1 Test/F: ≈ 14-18 дней от этапов A - E**
ЭТАП A Взятие образца опухоли у пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)	**ЭТАП A** Взятие образца опухоли у пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)	**ЭТАП A** Взятие образца опухоли у пациента (необязательно может быть заморожен перед этапом B)
ЭТАП B Подготовительное первое размножение (физическая фрагментация, до 60 фрагментов на контейнер, культивирование ≈1 день - 7/8 дней в среде с ИЛ-2)	**ЭТАП B** Подготовительное первое размножение (физическая фрагментация, до 60 фрагментов на контейнер, культивирование ≈1 день - 7/8 дней в среде с ИЛ-2 и OKT-3)	**ЭТАП B** Подготовительное первое размножение (физическая фрагментация, до 60 фрагментов на контейнер, культивирование ≈1 день - 7/8 дней в среде с ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующими фидерными клетками)
ЭТАП C Переход от подготовительного первого размножения к быстрому второму (TIL с этапа B прямо на этап D на 7/8 день)	**ЭТАП C** Переход от подготовительн. первого размножения к быстрому второму (TIL с этапа B прямо на этап D на 7/8 день)	**ЭТАП C** Переход от подготовительн. первого размножения к быстрому второму (TIL с этапа B прямо на этап D на 7/8 день)
ЭТАП D Быстрое второе размнож-е (TIL культивир. в рост. среде с ИЛ-2, OKT-3 и фидерными антигенпрезентирующими клетками Масштабир. на 10-11 дни + дополнит. ИЛ-2)	**ЭТАП D** Быстрое второе размнож-е (TIL культивир. в рост. среде с ИЛ -2, OKT-3 и 2х фидерн. антигенпрезентирующих клеток; масштабирование на 10-11 дни и добавление дополнит. ИЛ-2)	**ЭТАП D** Быстрое второе размнож-е (TIL культивир. в рост. среде с ИЛ-2, OKT-3 и 2х фидерных антигенпрезентирующих клеток; масштабирование на 10-11 дни + дополнительный ИЛ-2)
ЭТАП E Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D	**ЭТАП E** Сбор TIL с этапа D
ЭТАП F Получение готового состава и/или перенос в пакет для инфузии (необязательно криоконсервирование)	**ЭТАП F** Получение готового состава и/или перенос в пакет для инфузии (необязательно криоконсервирование)	**ЭТАП F** Получение готового состава и/или перенос в пакет для инфузии (необязательно криоконсервирование)

Фиг. 1C

Модифицированный Gen 2-подобный процесс: около 22 дней от этапов A-E

ЭТАП A

Взятие образца опухоли у пациента
(необязательно может быть заморожен до этапа B;
необязательно образец опухоли может быть получен путем
трепанобиопсии/малой биопсии)

ЭТАП B1

Исходная культура
физическая фрагментация, до 60 фрагментов опухоли или до 10 трепанобиоптатов/малых биоптатов на контейнер, TIL культивир. 3 дня в ростовой среде с ИЛ-2

ЭТАП B2

Подготовительное первое размножение
TIL культивируют 8дней в ростовой среде с ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующими фидерными клетками

ЭТАП C

Переход от подготовительного первого размножения к второму быстрому размножению (прямо переводят TIL с этапа B на этап D на 11 день)

ЭТАП D

Быстрое второе размножение
(снижение объема; TIL культивируют в ростовой среде, содержащей ИЛ-2, OKT-3, 50X фидерныхАПК масштабирование на 16 день с добавлением дополнительного ИЛ-2

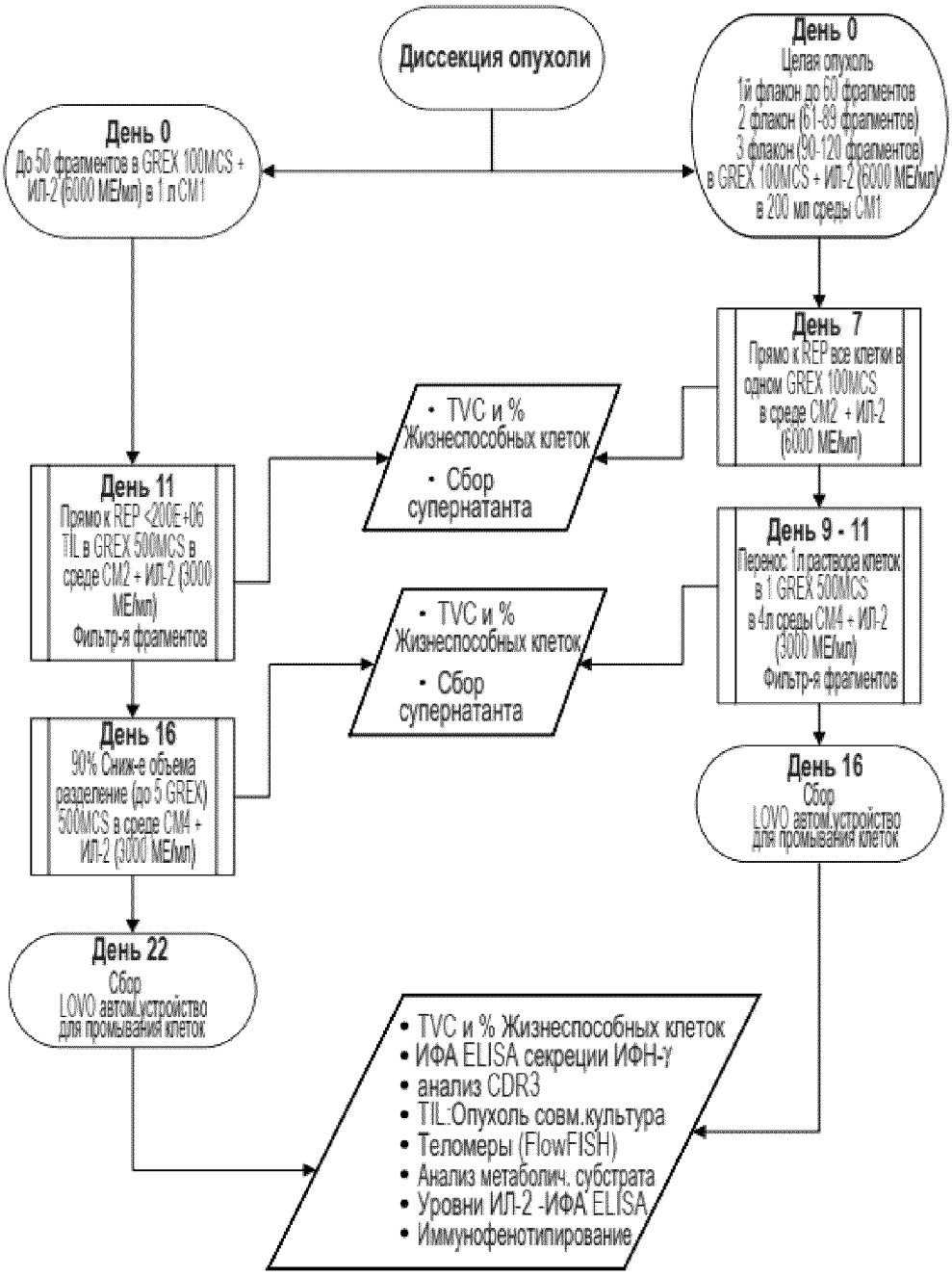
ЭТАП E

Сбор TIL с этапа D

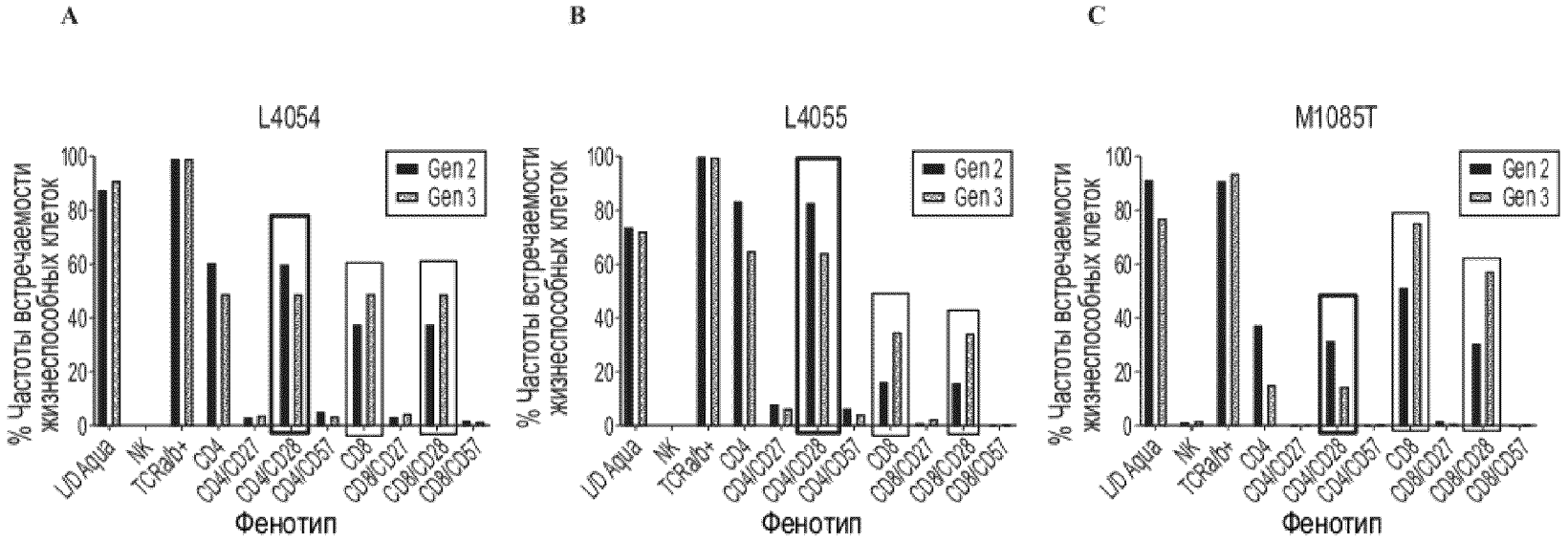
ЭТАП F

Получение готового состава и/или перенос в пакет для инфузии
(необязательно криоконсервация)

Фиг. 1D

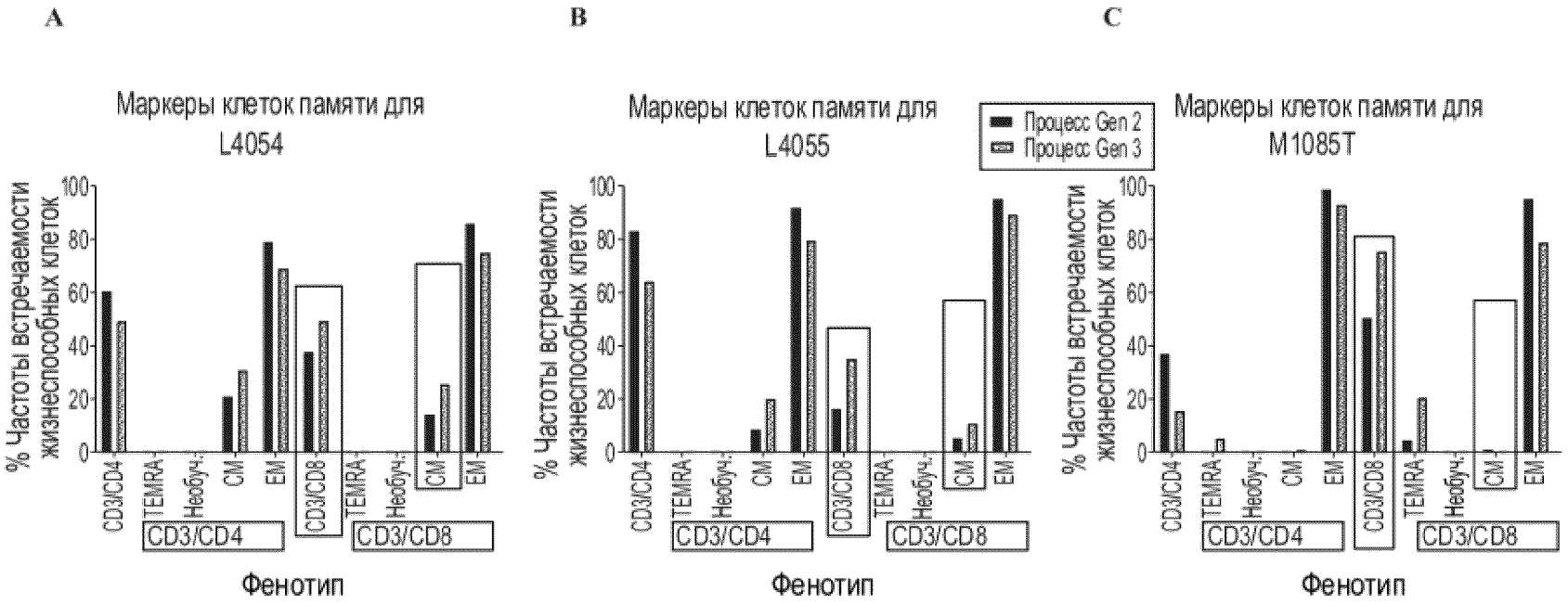

Диссекция опухоли
День 0
Целая опухоль
1й флакон до 60 фрагментов
2 флакон (61-89 фрагментов)
3 флакон (90-120 фрагментов)
в GREX 100MCS + ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
в 200 мл среды СМ1
День 0
До 50 фрагментов в GREX 100MCS +
ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) в 1 л СМ1
День 7
Прямо к REP все клетки в
одном GREX 100MCS
в среде СМ2 + ИЛ-2
(6000 МЕ/мл)
• TVC и %
Жизнеспособных клеток
• Сбор
супернатанта
День 11
Прямо к REP <200E+06
TIL в GREX 500MCS в
среде СМ2 + ИЛ-2 (3000
МЕ/мл)
Фильтр-я фрагментов
День 9 - 11
Перенос 1 л раствора клеток
в 1 GREX 500MCS
в 4л среды СМ4 + ИЛ-2
(3000 МЕ/мл)
Фильтр-я фрагментов
• TVC и %
Жизнеспособных клеток
• Сбор
супернатанта
День 16
90% Сниж-е объема
разделение (до 5 GREX)
500MCS в среде СМ4 +
ИЛ-2 (3000 МЕ/мл)
День 16
Сбор
LOVO автом.устройство
для промывания клеток
День 22
Сбор
LOVO автом.устройство
для промывания клеток
• TVC и % Жизнеспособных клеток
• ИФА ELISA секреции ИФН-γ
• анализ CDR3
• TIL:Опухоль совм.культура
• Теломеры (FlowFISH)
• Анализ метаболич. субстрата
• Уровни ИЛ-2 -ИФА ELISA
• Иммунофенотипирование

Фиг. 2



ID опухоли	L4054		L4055		M1085T	
Процесс	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Число фрагментов	21	21	24	24	16	16

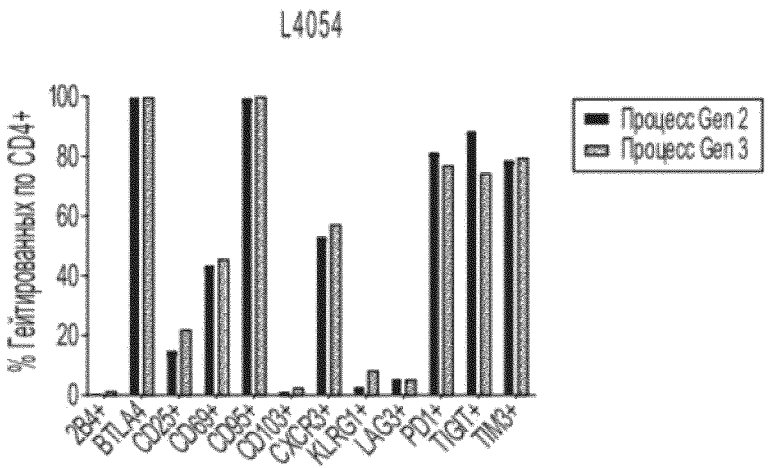
Фиг. 3



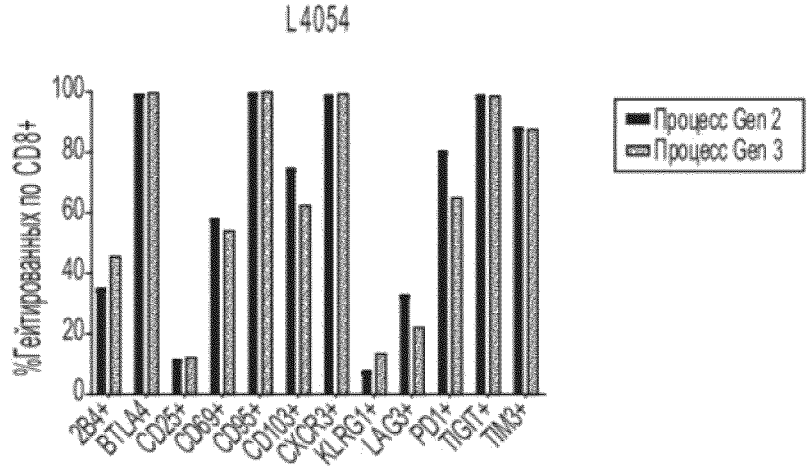
ID опухоли	L4054		L4055		M1085T	
Процесс	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Число фрагментов	21	21	24	24	16	16

Фиг. 4

A

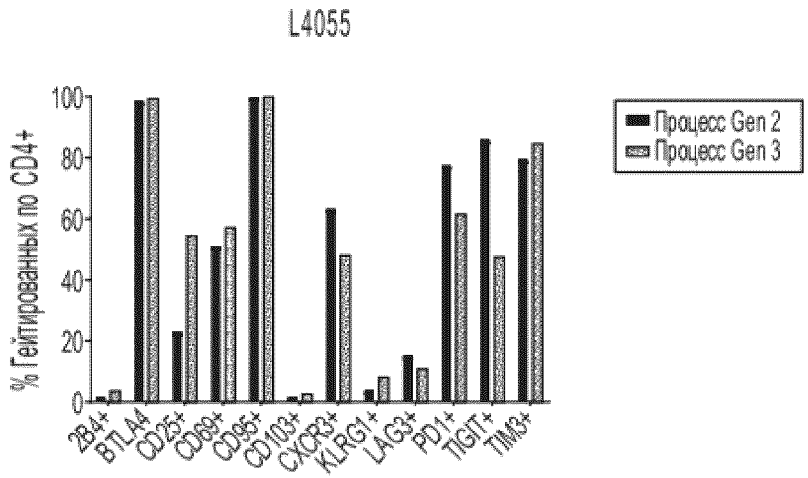

L4054
% Гейтированных по CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

B

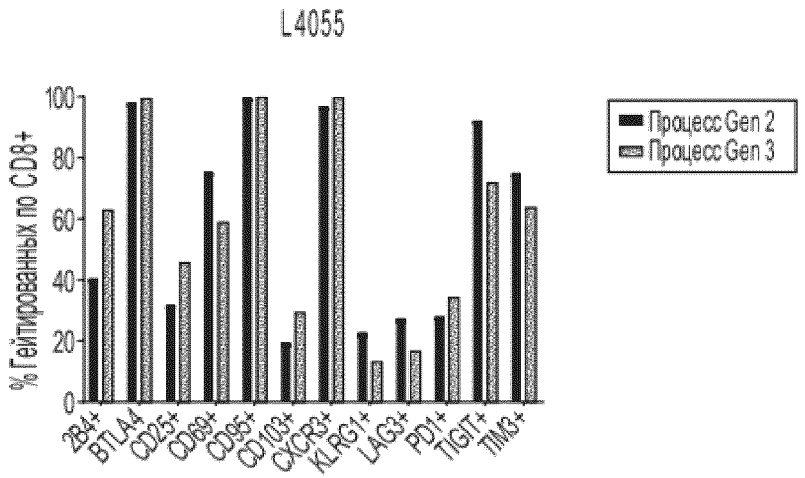

L4054
%Гейтированных по CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

Фиг. 5

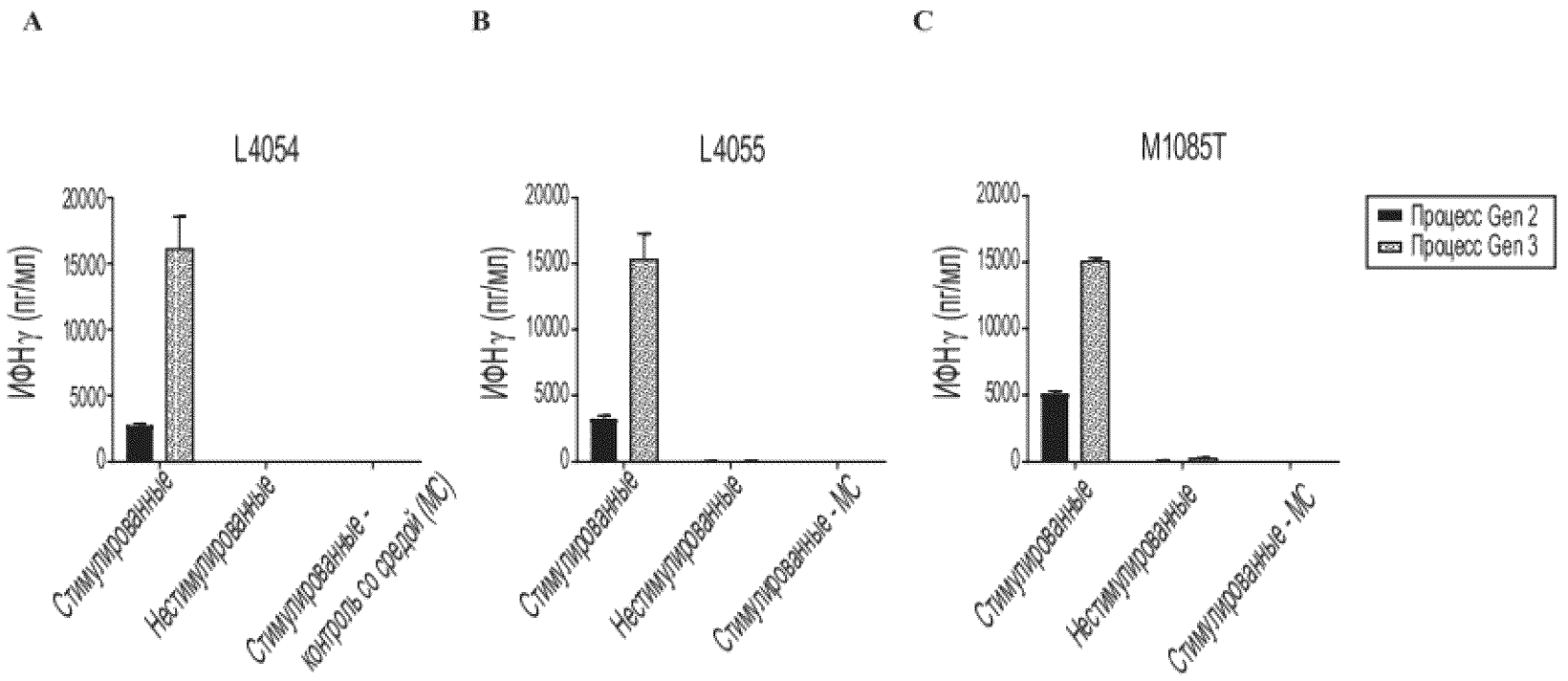
A


L4055
% Гейтированных по CD4+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

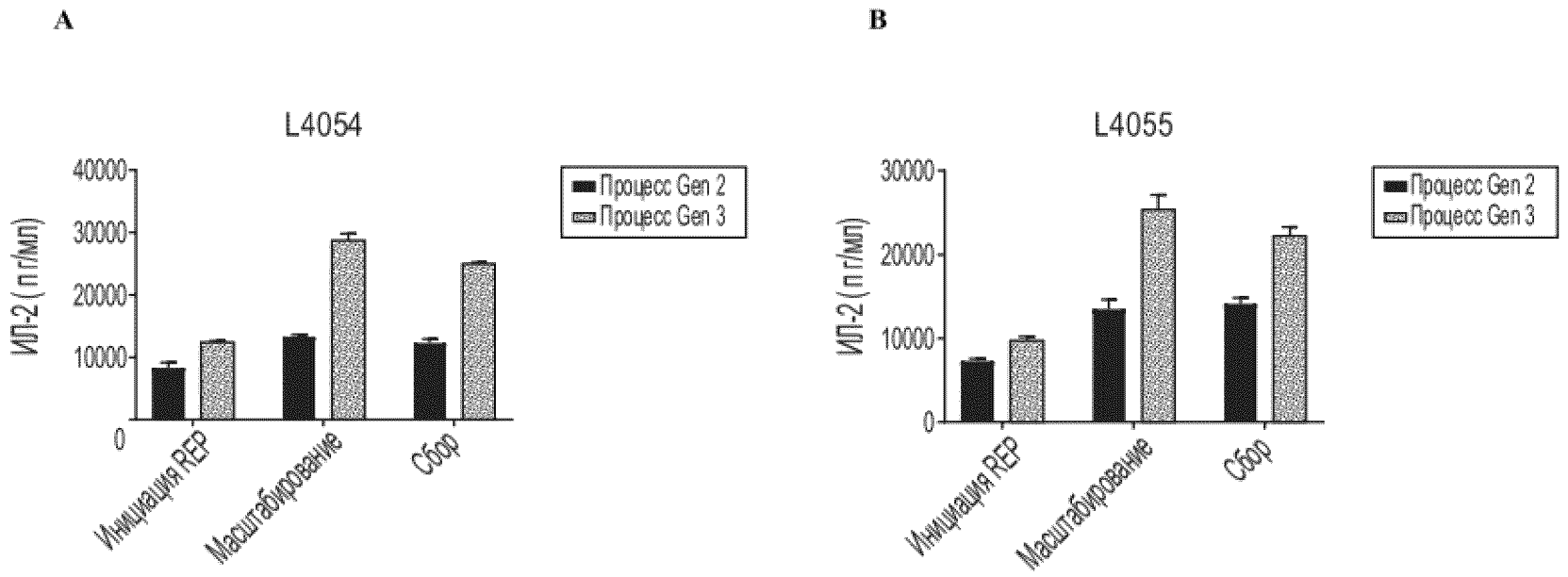
B


L4055
% Гейтированных по CD8+
100
80
60
40
20
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

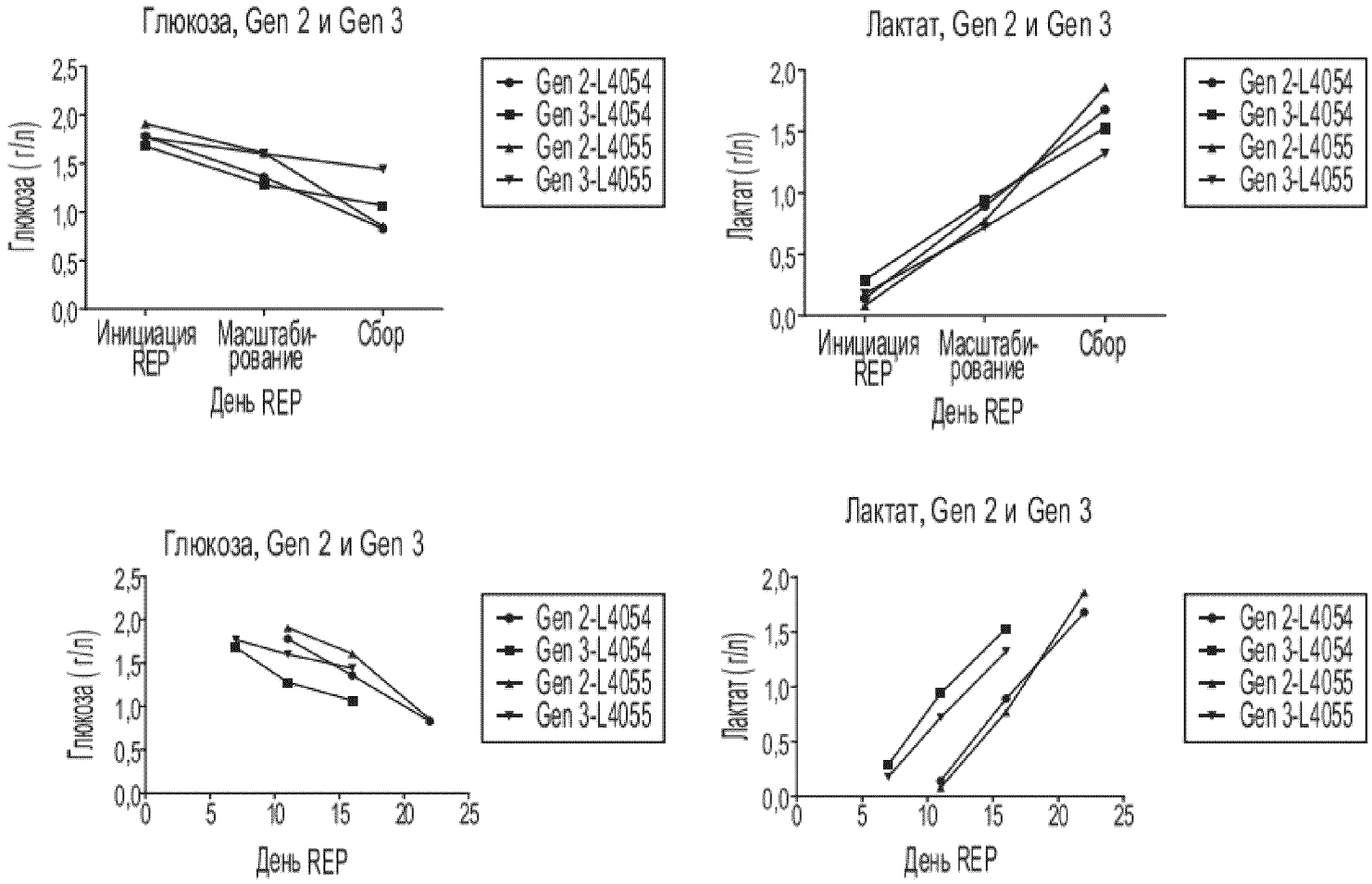
Фиг. 6


A
B
C
L4054
L4055
M1085T
ИФНγ (пг/мл)
20000
15000
10000
5000
0
Стимулированные
Нестимулированные
Стимулированные - контроль со средой (МС)
Стимулированные - МС
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

Фиг. 7


A
L4054
ИЛ-2 (п г/мл)
40000
30000
20000
10000
0
Инициация REP
Масштабирование
Сбор
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3
B
L4055
ИЛ-2 (п г/мл)
30000
20000
10000
0
Инициация REP
Масштабирование
Сбор
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

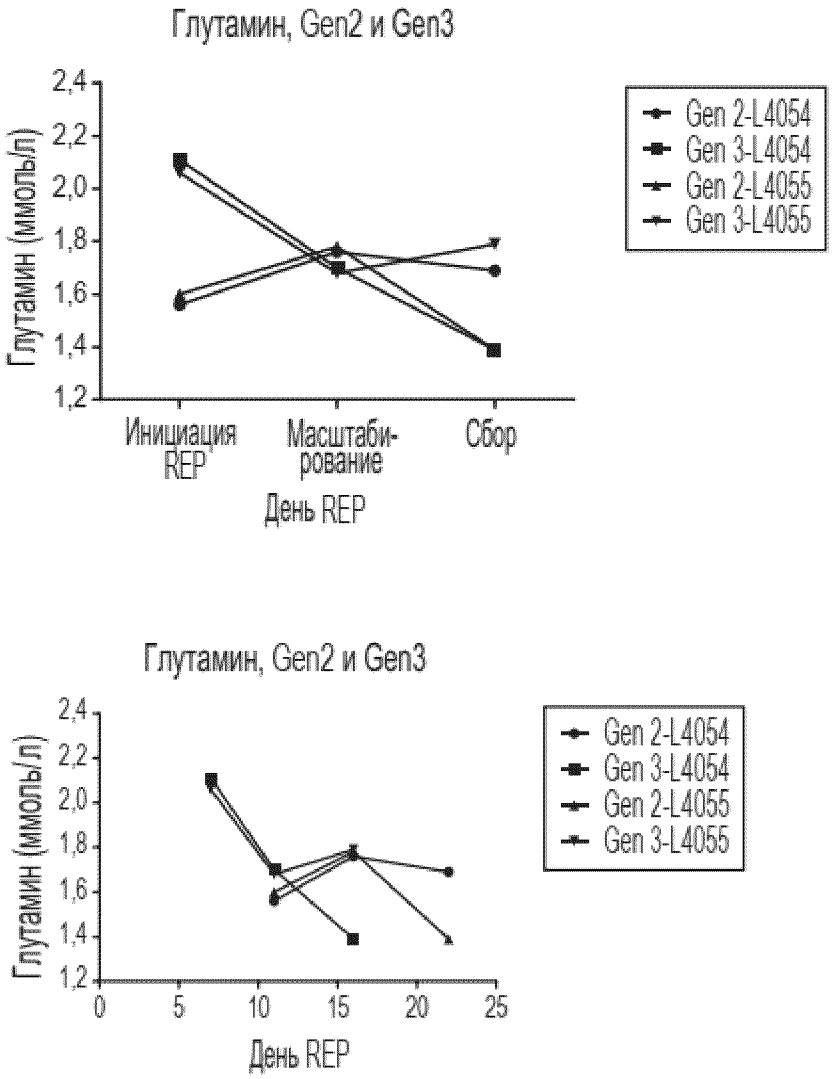
Фиг. 8


Глюкоза, Gen 2 и Gen 3
Глюкоза (г/л)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
Лактат, Gen 2 и Gen 3
Лактат (г/л)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
Глюкоза, Gen 2 и Gen 3
Глюкоза (г/л)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
25
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
Лактат, Gen 2 и Gen 3
Лактат (г/л)
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0
5
10
15
20
25
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

A **B**

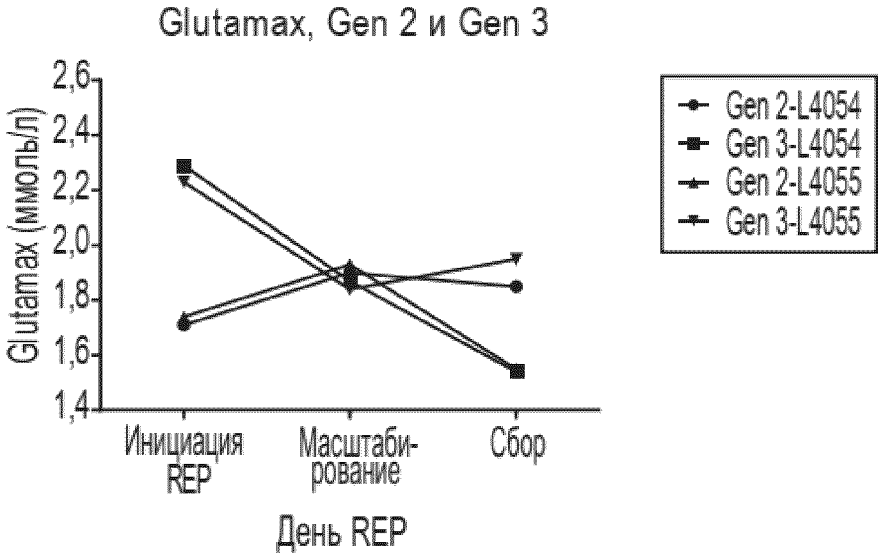
Фиг. 9

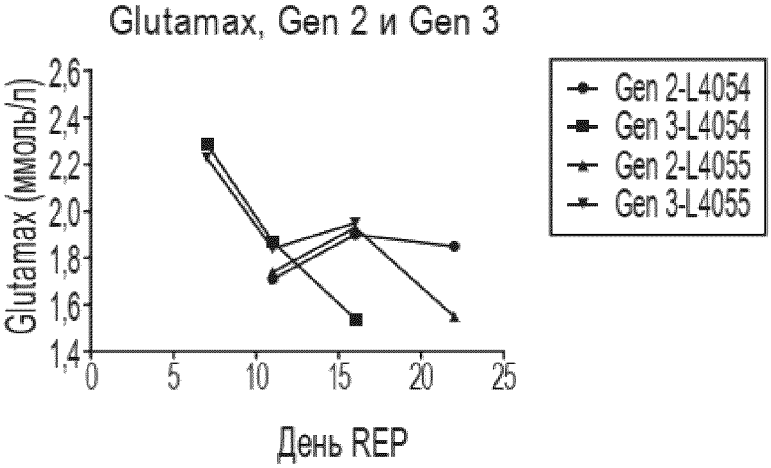
A


Глутамин, Gen2 и Gen3
Глутамин (ммоль/л)
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055
Глутамин, Gen2 и Gen3
Глутамин (ммоль/л)
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
1,2
0
5
10
15
20
25
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

Фиг. 10A

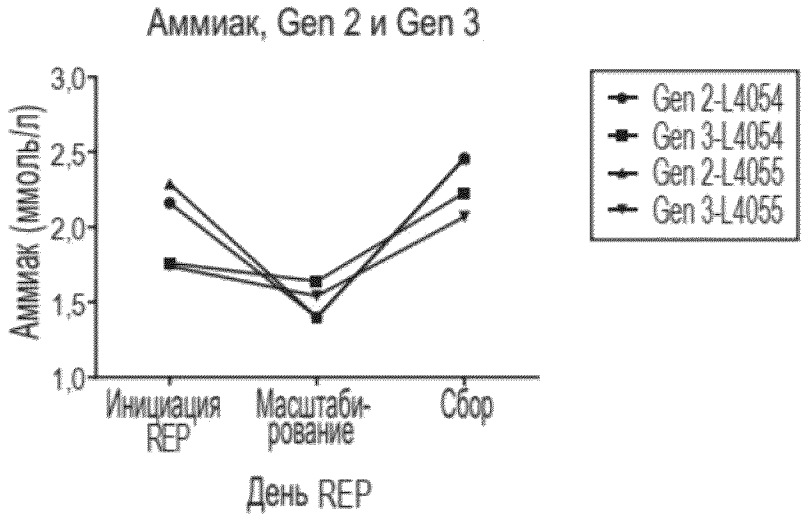
B

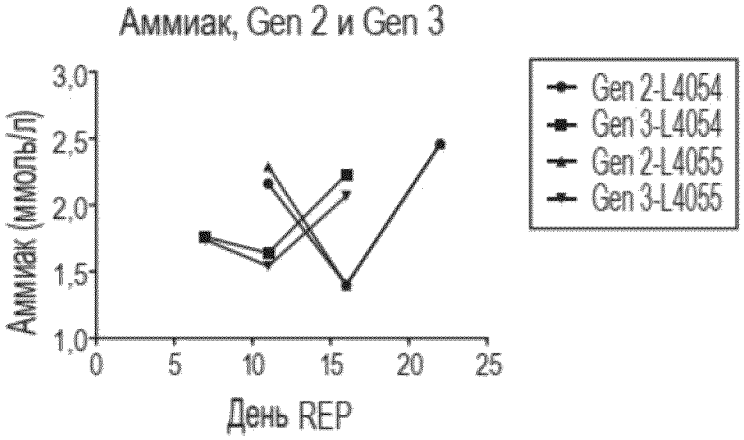

Glutamax, Gen 2 и Gen 3
Glutamax (ммоль/л)
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055


Glutamax, Gen 2 и Gen 3
Glutamax (ммоль/л)
2,6
2,4
2,2
2,0
1,8
1,6
1,4
0
5
10
15
20
25
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

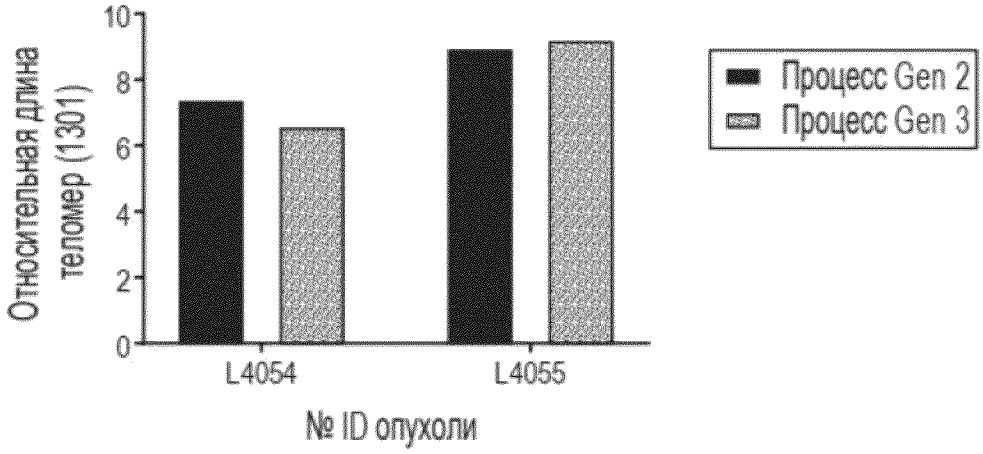
Фиг. 10B

C

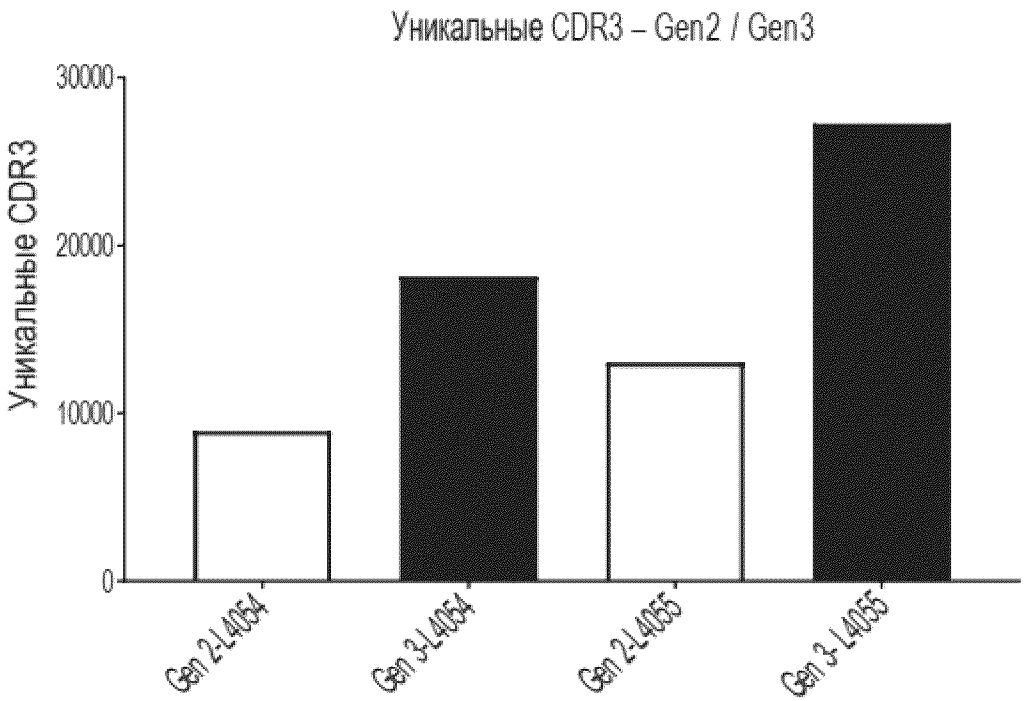

Аммиак, Gen 2 и Gen 3
Аммиак (ммоль/л)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
Инициация REP
Масштаби-рование
Сбор
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055


Аммиак, Gen 2 и Gen 3
Аммиак (ммоль/л)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0
5
10
15
20
25
День REP
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

Фиг. 10C

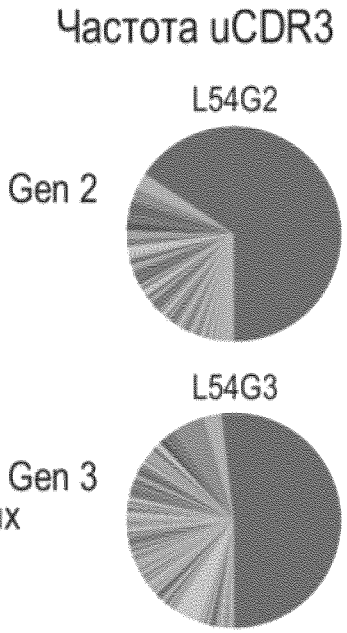

Относительная длина теломер (1301)
10
8
6
4
2
0
L4054
L4055
№ ID опухоли
Процесс Gen 2
Процесс Gen 3

Фиг. 11


Уникальные CDR3 – Gen2 / Gen3
Уникальные CDR3
30000
20000
10000
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

Фиг. 12

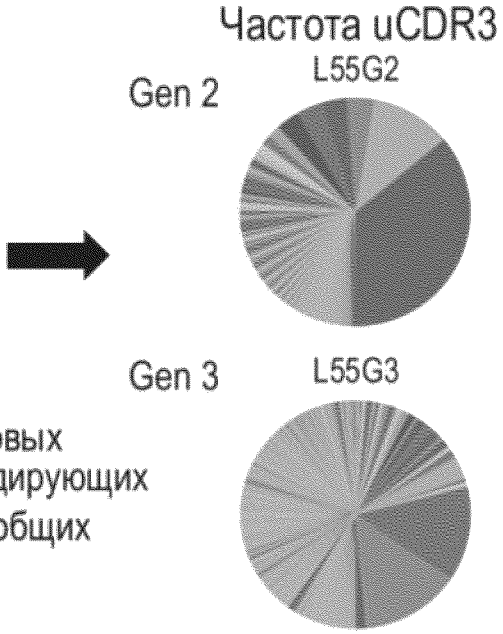
Кол-во uCDR3 (% Перекр.)	Все uCDR3		Лидирующие 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48,85%)	205	199 (97,07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223



- 199 последовательностей являются общими для итоговых продуктов Gen 3 и Gen 2, что соответствует 97,07% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с итоговым продуктом Gen 3.

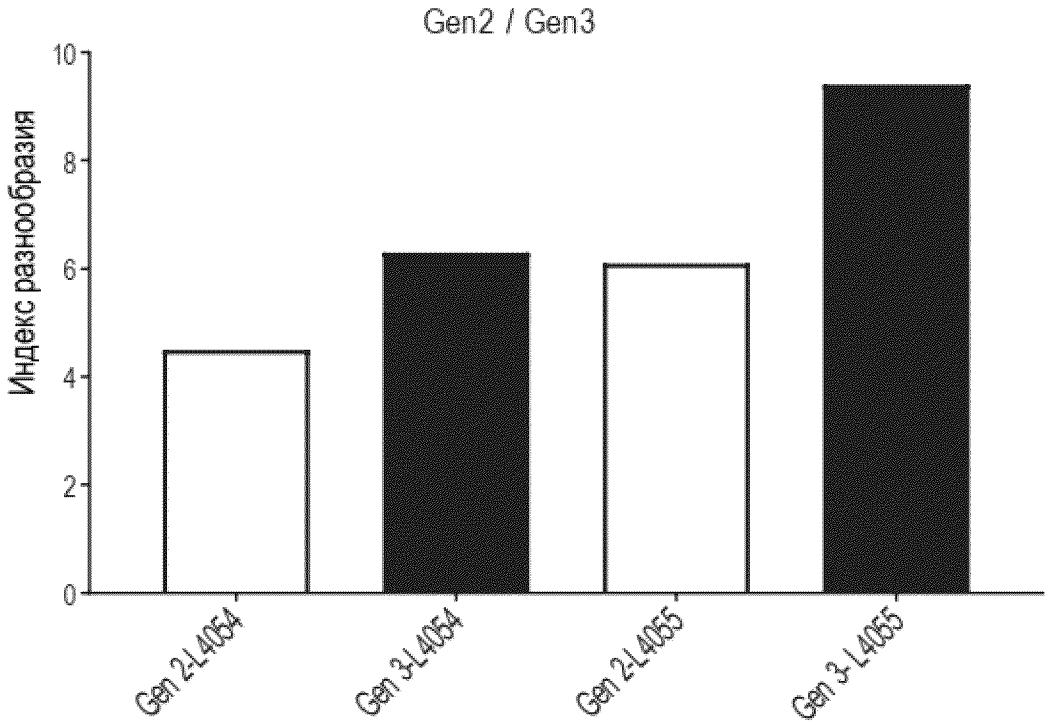
Фиг. 13

Кол-во uCDR3 (% Перекр.)	Все uCDR3		Лидирующие 80% uCDR3	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50,77%)	1843	1833 (99,45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616



- 1833 последовательностей являются общими для итоговых продуктов Gen 3 и Gen 2, что соответствует 99,45% лидирующих 80% уникальных последовательностей CDR3 из Gen 2, общих с итоговым продуктом Gen 3.

Фиг. 14


Gen2 / Gen3
Индекс разнообразия
10
8
6
4
2
0
Gen 2-L4054
Gen 3-L4054
Gen 2-L4055
Gen 3-L4055

Фиг. 15

Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее среднее Кол-во*Объем
188	Всего	2,46E+05	2,28E+05	2,31E+05	2,35E+05	4,42E+07
	Живые	2,37E+05	2,27E+05	2,26E+05	2,30E+05	4,32E+07
	Мертвые	9,26E+03	7,03E+02	4,63E+03	4,86E+03	9,14E+05
	% Жизне-способности	96,20%	99,70%	98,00%	97,97%	
188	Всего	8,26E+04	8,00E+04	7,66E+04	7,97E+04	1,50E+07
	Живые	7,60E+04	7,54E+04	6,89E+04	7,34E+04	1,38E+07
	Мертвые	6,61E+03	4,63E+03	7,73E+03	6,32E+03	1,19E+06
	% Жизне-способности	92,00%	94,20%	89,90%	92,03%	
200	Всего	2,44E+04	4,20E+04	1,05E+04	2,56E+04	5,13E+06
	Живые	1,74E+04	2,80E+04	7,03E+03	1,75E+04	3,50E+06
	Мертвые	7,03E+03	1,40E+04	3,48E+03	8,17E+03	1,63E+06
	% Жизне-способности	71,20%	66,70%	66,90%	68,27%	

Фиг. 16

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее среднее Кол-во*Объем
Gen 3 #L4054 Первый раунд	1000	Всего	9,11E+05	1,01E+06	1,08E+06	1,00E+06	1,00E+09
		Живые	8,60E+05	9,34E+05	1,01E+06	9,35E+05	9,35E+08
		Мертвые	5,09E+04	7,49E+04	6,74E+04	6,44E+04	6,44E+07
		%Жизнесп.	94,40%	92,60%	93,70%	93,57%	
Gen 3 #L4055 Второй раунд	1000	Всего	8,56E+05	9,04E+05	8,81E+05	8,80E+05	8,80E+08
		Живые	8,24E+05	8,67E+05	8,42E+05	8,44E+05	8,44E+08
		Мертвые	3,17E+04	3,70E+04	3,87E+04	3,58E+04	3,58E+07
		%Жизнесп.	96,30%	95,90%	95,60%	95,93%	
Gen 3 #M1085T	200	Всего	2,32E+06	2,25E+06		2,29E+06	4,57E+08
		Живые	1,68E+06	1,57E+06		1,63E+06	3,25E+08
		Мертвые	6,41E+05	6,79E+05		6,60E+05	1,32E+08
		%Жизнесп.	72,40%	69,90%		71,15%	
Gen 2 #L4054 Первый раунд	142	Всего	1,08E+06	9,84E+05	1,00E+06	1,02E+06	1,45E+08
		Живые	1,06E+06	9,71E+05	9,79E+05	1,00E+06	1,42E+08
		Мертвые	2,05E+04	1,26E+04	2,12E+04	1,81E+04	2,57E+06
		%Жизнесп.	98,10%	98,70%	97,90%	98,23%	
Gen 2 #L4055 Второй раунд	96	Всего	2,93E+05	3,05E+05	2,64E+05	2,87E+05	2,76E+07
		Живые	2,88E+05	2,96E+05	2,55E+05	2,80E+05	2,68E+07
		Мертвые	4,72E+03	9,14E+03	8,26E+03	7,37E+03	7,08E+05
		%Жизнесп.	98,40%	97,00%	96,90%	97,43%	
Gen 2 #M1085T	200	Всего	9,10E+04	5,60E+04		7,35E+04	1,47E+07
		Живые	8,05E+04	4,21E+04		6,13E+04	1,23E+07
		Мертвые	1,04E+04	1,39E+04		1,22E+04	2,43E+06
		%Жизнесп.	88,50%	75,20%		81,85%	

Фиг. 17

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее среднее Кол-во*Объем
Gen 3 #L4054 Первый раунд - пре-LOVO	1243,1	Всего	1,40E+07	1,46E+07		1,43E+07	1,78E+10
		Живые	1,32E+07	1,35E+07		1,34E+07	1,66E+10
		Мертвые	8,47E+05	1,12E+06		9,84E+05	1,22E+09
		%Жизнесп.	94,00%	92,40%		93,20%	
Gen 3 #L4054 Первый раунд- после LOVO	330	Всего	6,35E+07	6,07E+07		6,21E+07	2,05E+10
		Живые	5,72E+07	5,44E+07		5,58E+07	1,84E+10
		Мертвые	6,35E+06	6,27E+06		6,31E+06	2,08E+09
		%Жизнесп.	90,00%	89,70%		89,85%	
ID	Объем (мл)		1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее среднее Кол-во*Объем
Gen 3 #L4055 Второй раунд - пре-LOVO	1032,6	Всего	9,49E+06	1,05E+07		1,00E+07	1,03E+10
		Живые	8,90E+06	9,79E+06		9,35E+06	9,65E+09
		Мертвые	5,85E+05	6,75E+05		6,30E+05	6,51E+08
		%Жизнесп.	93,80%	93,60%		93,70%	
Gen 3 #L4055 Второй раунд - после LOVO	330	Всего	3,31E+07	2,82E+07	3,18E+07	3,07E+07	1,01E+10
		Живые	2,85E+07	2,46E+07	2,77E+07	2,66E+07	8,67E+09
		Мертвые	4,56+06	3,61+06	4,12E+06	4,09E+06	1,35E+09
		%Жизнесп.	86,20%	87,20%	87,10%	86,70%	
ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общ. ср. кол-во *Объем
Gen 3 #M1085T пре-LOVO	5000	Всего	2,26E+06	2,64E+06		2,45E+06	1,23E+10
		Живые	1,97E+06	2,31E+06		2,14E+06	1,07E+10
		Мертвые	2,85E+05	3,30E+05		3,08E+05	1,54E+09
		%Жизнесп.	87,40%	87,50%		87,45%	
Gen 3 #M1085T после LOVO до добавления CS10	150	Всего	6,27E+07	5,44E+07		5,86E+07	8,78E+09
		Живые	5,50E+07	4,74E+07		5,12E+07	7,68E+09
		Мертвые	7,70E+06	6,96E+06		7,33E+06	1,10E+09
		%Жизнесп.	87,70%	87,20%		87,45%	
ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общ. ср. кол-во *Объем
Gen 2 #L4054 Первый раунд	913	Всего	3,53E+06	4,30E+06		3,92E+06	3,57E+09
		Живые	3,35E+06	4,00E+06		3,68E+06	3,36E+09
		Мертвые	1,75E+05	3,03E+05		2,39E+05	2,18E+08
		%Жизнесп.	95,00%	93,00%		94,00%	
Gen 2 #L4055 Второй раунд	292	Всего	1,29E+07	1,36E+07		1,33E+07	3,87E+09
		Живые	1,16E+07	1,23E+07		1,20E+07	3,49E+09
		Мертвые	1,27E+06	1,23E+06		1,25E+06	3,65E+08
		%Жизнесп.	90,10%	90,90%		90,50%	
Gen 2 #M1085T	369	Всего	6,75E+06	6,98E+06		6,87E+06	2,53E+09
		Живые	5,22E+06	5,58E+06		5,40E+06	1,99E+09
		Мертвые	1,54E+06	1,40E+06		1,47E+06	5,42E+08
		%Жизнесп.	77,20%	79,90%		78,55%	

Фиг. 18

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общ. ср. кол-во *Объем
Gen 2 #L4054 Первый раунд - пре- LOVO	1385,7	Всего	3,55E+07	4,12E+07	4,03E+07	3,90E+07	5,40E+10
		Живые	3,26E+07	3,73E+07	3,67E+07	3,55E+07	4,92E+10
		Мертвые	2,93E+06	3,87E+06	3,59E+06	3,46E+06	4,80E+09
		%Жизнесп.	91,70%	90,60%	91,10%	91,13%	
Gen 2 #L4054 Первый раунд - после LOVO	330	Всего	1,70E+08	1,79E+08	1,68E+08	1,72E+08	5,69E+10
		Живые	1,49E+08	1,58E+08	1,48E+08	1,52E+08	5,01E+10
		Мертвые	2,16E+07	2,04E+07	2,00E+07	2,07E+07	6,82E+09
		%Жизнесп.	87,30%	88,60%	88,10%	87,95%	

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общ. ср. кол-во *Объем
Gen 2 #L4055 Первый раунд - пре-LOVO	1968,2	Всего	3,15E+07	2,51E+07	2,97E+07	2,88E+07	5,66E+10
		Живые	2,89E+07	2,25E+07	2,72E+07	2,62E+07	5,16E+10
		Мертвые	2,57E+06	2,61E+06	2,52E+06	2,57E+06	5,05E+09
		%Жизнесп.	91,80%	89,60%	91,50%	90,97%	
Gen 2 #L4055 Первый раунд - после LOVO	330	Всего	2,33E+08	1,89E+08	1,53E+08	1,92E+08	6,33E+10
		Живые	2,03E+08	1,66E+08	1,33E+08	1,67E+08	5,52E+10
		Мертвые	3,00E+07	2,24E+07	1,94E+07	2,39E+07	7,90E+09
		%Жизнесп.	87,10%	88,10%	87,30%	87,50%	

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общ. ср. кол-во *Объем
Gen 2 #M1085T - пре-LOVO	Н/О	Всего				#DIV/0!	#DIV/0!
		Живые				#DIV/0!	#DIV/0!
		Мертвые				#DIV/0!	#DIV/0!
		%Жизнесп.				#DIV/0!	
Gen 2 #M1085T - после LOVO до добавления CS10	150	Всего	8,51E+07	9,05E+07		8,78E+07	1,32E+10
		Живые	7,33E+07	7,79E+07		7,56E+07	1,13E+10
		Мертвые	1,18E+07	1,26E+07		1,22E+07	1,83E+09
		%Жизнесп.	86,10%	86,10%		86,10%	

Для L4054 Gen 2 подсчитанное после LOVO кол-во клеток экстраполируют на 4 флакона, т.к. это общее кол-во использовали в исследовании. 1 флакон был загрязнен, и экстраполяцию в общей сложности осуществляли для = 6,67e+10

Фиг. 19

	S1IS2IBcel Жив| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив\CD14+| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /CD3-/NK| Частота нулев.(%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /CD19| Частота нулев.(%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD 4| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD 4/CD27| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD 4/CD28| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD 4/CD56| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD 4/CD57| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q1: CCR7- PE-A- CD45RA- AF700-A+| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q2: CCR7- PE-A+ CD45RA- AF700-A+| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q3: CCR7- PE-A+ CD45RA- AF700-A-| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q4: CCR7- PE-A- CD45RA- AF700-A-| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD4/ Q5: CD62L- B421-A- CD45RA- AF700-A+| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q6: CD62L- B421-A+ CD45RA- AF700-A+| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/CD4/ Q7: CD62L- B421-A+ CD45RA- AF700-A-| Частота исх (%)	S1IS2IBcel Жив /CD14- /TCRab/CD4/ Q8: CD62L- B421-A- CD45RA- AF700-A-| Частота исх (%)
											TEMRA	Необуч.	CM	EM	TEMRA	Необуч.	CM	EM
A1 gen2_1 fcs	87,2	1,77E-03	0,66	0	98,9	60,6	3,35	60,1	0,06	5,34	0,25	0,073	3,37	96,3	0,056	0,032	21,1	78,8
A2 gen2_2 fcs	73,5	0	0,12	0	99,7	83,1	7,94	82,6	0,14	6,18	0,16	0,047	2,39	97,4	0,036	0,014	8,3	91,6
A3 gen3_1 fcs	90,4	0	0,197	1,72e-03	98,8	48,1	4,5	48,9	0,18	4,02	0,2	0,059	2,29	97,5	0,059	0,049	30,7	69,2
A4 gen3_2 fcs	72,1	2,56E-03	0,44	0,018	99,3	64,4	6,27	64	0,26	4,3	0,25	0,18	7,12	92,5	0,12	0,072	20,1	79,7
A5 MKTK fcs	93,7	6,07	11,6	6,12	70,9	41,1	35,6	40,4	0,041	0,31	0,91	36,1	16,2	46,9	11,4	23,1	16,4	49,1
(d) области включения для построения гейтинга TCRab+= CD3+																		

S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/ CD8| Частота нулев.(%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/ CD8/CD27| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/ CD8/CD28| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/ CD8/CD56| Частота нулев.(%)	S1IS2IBcel Жив/CD14- /TCRab/ CD8/CD57| Частота нулев. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q1: CCR7-PE-A- , CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q2: CCR7-PE-A+ , CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые/ CD14-/TCRab/ CD8/Q3: CCR7-PE-A+ , CD45RA-AF700-A-| Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q4: CCR7-PE-A- , CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q5: CD62L-BV421-A- , CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q6: CD62L-BV421-A+ , CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q7: CD62L-BV421-A+ , CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Живые CD14- /TCRab/CD8/Q8: CD62L-BV421-A- , CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1IS2IBcel/Жив CD14-/TCRgd| Частота исх. (%)
					TEMRA	Необуч.	CM	EM	TEMRA	Необуч.	CM	EM	
37,9	3,25	37,3	0,41	2,31	0,028	0	4,24	95,7	0,033	9,37E-03	14,1	85,9	0
16,1	1,08	15,8	0,67	0,17	0,042	0,014	4,76	95,2	0,071	0,014	5,24	94,7	0
49,2	4,83	48,5	0,71	1,53	0,056	6,97E-03	3,11	96,8	0,077	0,017	25,5	74,4	0
34,6	2,46	34	1,57	0,5	0,18	0,13	10,2	89,5	0,29	0,044	10,6	89,1	0
29,6	25,8	27,4	0,75	2,81	8,05	40,9	3,02	48	22,3	27,1	6,23	44,3	0

Фиг. 20

	CD3/CD4					
	CD38	HLA-DR	CCR7- CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+ CD45RA-	CCR7-CD45RA-
GEN 3 - День 16 - Сбор	42,4	95,2	4,96	0,7	1,22	93,1
GEN 2 - День 22 - Сбор	50,4	98	0,61	0,13	0,3	99

CD3	CD3/CD8					
CD8	CD38	HLA-DR	CCR7-CD45RA+	CCR7+CD45RA+	CCR7+CD45RA-	CCR7-CD45RA-
77,6	83,2	90,3	20,5	0,013	0,06	79,5
54,3	88	83,2	4,24	0,026	1,05	94,7

Фиг. 21

				CD4											
	CD3+		CD4+	2B4+	BTLA+	CD103+	CD25+	CD69+	CD95+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 2-L4054				0,61	99,50	1,05	14,80	4,20	99,40	52,90	2,65	5,36	81,20	88,40	78,60
Gen 3-L4054				1,11	99,50	2,28	21,70	45,40	99,70	56,90	8,06	5,07	76,70	74,10	79,30
Gen 2-L4055				1,61	98,60	1,56	23,10	51,10	99,80	63,30	3,86	15,30	77,60	86,00	79,50
Gen 3-L4055				3,57	99,30	2,61	54,40	57,00	99,90	48,00	8,02	10,80	61,40	47,50	84,60
				CD8											
Gen 2-L4054			CD8+	2B4+	BTLA4+	CD103+	CD25+	CD95+	CD69+	CXCR3+	KLRG1+	LAG3+	PD1+	TIGIT+	TIM3+
Gen 3-L4054				35,20	99,50	74,90	11,80	99,80	58,30	99,10	8,03	33,10	80,60	99,10	88,30
Gen 2-L4055				45,50	99,60	62,40	12,10	99,90	54,00	99,30	13,40	22,10	64,90	98,50	87,50
Gen 3-L4055				40,60	98,20	19,50	32,00	99,70	75,50	96,80	22,80	27,40	28,10	92,30	75,10
				62,80	99,20	29,20	45,50	99,70	58,80	99,60	13,10	16,60	34,10	71,70	63,60

Фиг. 22

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	MC-Стимулир. d xG2	MC-Стимулир. xG2	MC-Стимулир. d xG2	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	K/P*
B	STD2	STD2	STD2	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	MC-Стимулир. xG2	MC-Стимулир. xG2	MC-Стимулир. d xG2	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	K/P*
C	STD3	STD3	STD3	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	TIL- Gen 2-не-стимулир.	MC-Нестим. xG2	MC-Нестим. xG2	MC-Нестим. xG2	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	3	3	3	K/P*
D	STD4	STD4	STD4	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	TIL- Gen 2-не стимулир.	MC-Нестим. xG2	MC-Нестим. xG2	MC-Нестим. xG2	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	9	9	9	K/P*
E	STD5	STD5	STD5	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	MC-стимулир. d xG3	MC-стимулир. d xG3	MC-стимулир. d xG3	ID лунки
	62,5	62,5	62,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	K/P*
F	STD6	STD6	STD6	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	MC-стимулир. d xG3	MC-стимулир. d xG3	MC-стимулир. d xG3	ID лунки
	31,3	31,3	31,3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	K/P*
G	STD7	STD7	STD7	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	TIL- Gen 3-не-стимулир.	MC-Нестим. xG3	MC-Нестим. xG3	MC-Нестим. xG3	ID лунки
	15,6	15,6	15,6	27	27	27	27	27	27	3	3	3	K/P*
H	STD8	STD8	STD8	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	TIL- Gen 3-не стимулир.	MC-Нестим. xG3	MC-Нестим. xG3	MC-Нестим. xG3	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	9	9	9	K/P*

22,6
22,6

* Концентрация/Кратность разведения

Фиг. 23A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12							Средн.	Средн.
A	2.865	2.892	2.836	2.797	2.184	2.918	0.117	0.116	0.117	0.105	0.108	0.102	450	Gel 2-Стимулир. + TIL 1:3	2890.216	3084.946	3055.126	2676.76267	2757.81
	1.059	1.058	1.05	1.035	0.806	1.041	0.041	0.043	0.041	0.041	0.043	0.041	570	Gel 2-Стимулир. + TIL 1:9	2957.887	2117.46	3072.942	2719.42967	
	2.816	2.832	2.836	2.746	2.117	2.887	0.076	0.074	0.076	0.064	0.065	0.06	Дельта	Gel 2-Стимулир. + TIL 1:27	2952.028	2128.412	3035.11	2705.18333	
	994.773	1002.343	1004.079	963.405	694.982	1018.375	1.825	1.421	1.952	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация	Gel 2-Стимулир. + TIL 1:81	3261.251	2361.138	3167.212	2929.867	
				2890.216	2084.946	3055.126	5.474	4.262	5.855	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
B	1.655	1.654	1.65	1.161	0.9	1.215	0.107	0.107	0.108	0.106	0.105	0.102	450	Gel 3-Стимулир. + TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!
	0.046	0.046	0.046	0.045	0.047	0.045	0.042	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gel 3-Стимулир. + TIL 1:9	13273.546	>13500.00	13340.37	13306.5575	16089.32
	1.613	1.608	1.604	1.136	0.853	1.17	0.066	0.066	0.067	0.062	0.063	0.061	Дельта	Gel 3-Стимулир. + TIL 1:27	16947.994	16962.84	17161.47	17024.1	
	499.866	497.826	496.528	329.765	235.273	341.438	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация	Gel 3-Стимулир. + TIL 1:81	17571.427	18246.77	17992.49	17936.8973	
				2967.887	2117.46	3072.942	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
C	0.952	0.966	0.94	0.494	0.391	0.505	0.106	0.107	0.107	0.107	0.105	0.103	450	Gel 2-Нестимулир. + TIL 1:3	5.474	4.262	5.855	5.197	5.20
	0.044	0.048	0.043	0.042	0.042	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.042	570	Gel 2-Нестимулир. + TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.908	0.919	0.896	0.452	0.349	0.462	0.065	0.065	0.065	0.063	0.063	0.062	Дельта	Gel 2-Нестимулир. + TIL 1:27	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	253.244	256.8	249.399	109.334	78.83	112.411	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация	Gel 2-Нестимулир. + TIL 1:81	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
				2952.028	2128.412	3035.11	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
D	0.549	0.541	0.542	0.258	0.218	0.259	0.102	0.101	0.103	0.111	0.102	0.101	450	Gel 3-Нестимулир. + TIL 1:3	3.435	0.854	2.465	2.25133333	19.74
	0.044	0.044	0.043	0.042	0.041	0.047	0.041	0.042	0.042	0.05	0.042	0.043	570	Gel 3-Нестимулир. + TIL 1:9	10.304	<0.000	<0.000	10.304	
	0.505	0.498	0.499	0.216	0.176	0.212	0.06	0.059	0.061	0.061	0.06	0.057	Дельта	Gel 3-Нестимулир. + TIL 1:27	30.239	<0.000	31.588	30.9135	
	125.458	123.174	123.508	40.262	29.15	39.101	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация	Gel 3-Нестимулир. + TIL 1:81	9.644	4.039	92.74	35.4743333	
				3261.251	2361.138	3167.212	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
E	0.334	0.332	0.332	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.114	0.11	0.113	0.103	0.102	0.104	450	Gel 2-Среда Стимулир. + TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.043	0.042	0.042	0.07	0.0628	0.059	0.041	0.041	0.042	0.042	0.042	0.043	570	Gel 2-Контроль со ф. Стимулир. + TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.291	0.29	0.29	?????	?????	?????	0.073	0.069	0.072	0.062	0.061	0.061	Дельта	со фе дой					
	61.826	61.537	61.594	?????	?????	?????	1.145	0.285	0.822	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация						
				?????	?????	?????	3.435	0.854	2.465	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
F	0.222	0.222	0.224	3.84	3.865	3.853	0.114	0.104	0.107	0.101	0.103	0.101	450	Gel 2-Контроль со ср. Стимулир + TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.042	0.043	0.042	0.058	0.058	0.057	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gel 2-Контроль со ср. Стимулир + TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.18	0.179	0.181	3.782	3.807	3.796	0.073	0.063	0.066	0.059	0.062	0.059	Дельта						
	30.212	29.82	30.519	1474.838	>1500.000	1482.263	1.145	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация						
				13273.55	>13500.000	13340.37	10.304	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
G	0.174	0.17	0.172	1.995	1.997	2.017	0.114	0.109	0.114	0.106	0.107	0.104	450	Gel 2-Контроль со ф. Нестимулир + TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.041	0.041	0.041	0.048	0.047	0.049	0.042	0.042	0.041	0.042	0.041	0.042	570	Gel 2-Контроль со ф. Нестимулир + TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.132	0.128	0.131	1.947	1.949	1.968	0.073	0.067	0.073	0.063	0.065	0.062	Дельта						
	16.911	15.874	16.447	627.703	628.253	635.61	1.12	<0.000	1.17	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация						
				16947.99	16962.84	17161.47	30.239	<0.000	31.588	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
H	0.117	0.111	0.114	0.84	0.867	0.857	0.11	0.11	0.115	0.109	0.11	0.113	450	Gel 3-Контроль со ср. Стимулир.+ TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	30.28
	0.045	0.043	0.044	0.044	0.044	0.044	0.041	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570	Gel 3-Контроль со ф. Стимулир.+ TIL 1:9	<0.000	<0.000	60.557	60.557	
	0.072	0.068	0.07	0.797	0.822	0.813	0.069	0.068	0.073	0.067	0.067	0.071	Дельта						
	0.822	0.073	0.405	216.931	225.269	222.13	0.119	0.05	1.145	<0.000	<0.000	0.748	Концентрация						
				17571.43	18246.77	17992.49	9.644	4.039	92.74	<0.000	<0.000	60.557	Кратность разведения						

Фиг. 23B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
A	STD1	STD1	STD1	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	ID лунки					
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	КР*					
B	STD2	STD2	STD2	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	ID лунки					
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	КР*					
C	STD3	STD3	STD3	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	ID лунки					
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	3	3	3	КР*					
D	STD4	STD4	STD4	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-стимулир.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	TIL- Gen 2-Нестим.	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	МС-стимулир. xG2	ID лунки					
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	9	9	9	КР*					
E	STD5	STD5	STD5	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	МС-стимулир. xG3	МС-стимулир. xG3	МС-стимулир. xG3	ID лунки					
	62,5	62,5	62,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	КР*					
F	STD6	STD6	STD6	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	МС-стимулир. xG3	МС-стимулир. xG3	МС-стимулир. xG3	ID лунки					
	31,3	31,3	31,3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	КР*					
G	STD7	STD7	STD7	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3 Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3 Нестим.	МС-Нестим. xG3	МС-Нестим. xG3	МС-Нестим. xG3	ID лунки					
	15,6	15,6	15,6	27	27	27	27	27	27	3	3	3	КР*					
H	STD8	STD8	STD8	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-стимулир.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	TIL- Gen 3-Нестим.	МС-Нестим. xG3	МС-Нестим. xG3	МС-Нестим. xG3	ID лунки					
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	9	9	9	КР*					
													*Концентрация/Кратность разведения					

Фиг. 24A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Средн	Средн
A	2.875	2.859	2.817	3.185	2.823	2.8	0.128	0.126	0.132	0.11	0.111	0.107	450	Gen 2-Стимулир.+TIL 1:3	3435.858	2933.14	2905.979	3091.659	3261.65
	0.054	0.052	0.052	0.055	0.055	0.052	0.041	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen 2-Стимулир.+TIL 1:9	3676.282	3001.429	2926.474	3201.388333	
	2.824	2.807	2.825	3.129	2.768	2.748	0.087	0.085	0.09	0.069	0.069	0.065	Дельта	Gen 2-Стимулир.+TIL 1:27	3471.282	3097.07	2994.844	3187.732	
	1001,719	995,223	1003,493	1145,286	977,713	968,66	2.922	2,418	3.712	<0,000	<0.000	<0.000	Концентрация	Gen 2-Стимулир.+TIL 1:81	3910.397	3552.941	3234.126	3565.818	
				3435,858	2933,14	2905,979	8,766	7,254	11,136	<0,000	<0,000	<0,000	Кратность разведения						
B	1.669	1.635	1.668	1.411	1.199	1.177	0.119	0.118	0.126	0.112	0.112	0.114	450	Gen 3-Стимулир.+TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	#DIV/0!
	0.047	0.046	0.047	0.046	0.045	0.047	0.041	0.042	0.044	0.042	0.041	0.042	570	Gen 3-Стимулир.+TIL 1:9	13183.826	13421.925	12822.143	13142.63133	15303.54
	1.622	1.589	1.621	1.365	1.154	1.13	0.078	0.076	0.082	0.07	0.07	0.072	Дельта	Gen 3-Стимулир.+TIL 1:27	16231.22	16700.175	14586.268	15839.221	
	503,563	491,203	503,336	406,474	333,492	325,164	0,931	0,531	1,786	<0,000	<0,000	<0,000	Концентрация	Gen 3-Стимулир.+TIL 1:81	17140.679	17638.195	16007.402	16928.75867	
				3676,282	3001,429	2926,474	8,383	4,779	16,076	<0,000	<0,000	<0,000	Кратность разведения						
C	0.974	0.957	0.939	0.576	0.528	0.518	0.115	0.116	0.125	0.111	0.114	0.115	450	Gen 2-Нестимулир. +TIL 1:3	8.766	7.254	11.136	9.052	27.10
	0.045	0.043	0.045	0.045	0.043	0.045	0.041	0.044	0.042	0.041	0.043	0.043	570	Gen 2-Нестимулир. +TIL 1:9	8.383	4.779	16.076	9.746	
C	0.929	0.914	0.894	0.531	0.486	0.473	0.074	0.072	0.083	0.07	0.071	0.071	Дельта	Gen 2-Нестимулир. +TIL 1:27	5.632	<0.000	53.672	29.652	
	256,406	251,388	244,654	128,566	114,706	110,92	0,209	<0,000	1,988	<0,000	<0,000	<0,000	Концентрация	Gen 2-Нестимулир. +TIL 1:81	<0.000	<0.000	59.939	59,939	
				3471,282	3097,07	2994,844	5,632	<0,000	53,672	<0,000	<0,000	<0,000	Кратность разведения						
D	0.577	0.551	0.56	0.301	0.286	0.27	0.115	0.11	0.119	0.111	0.112	0.11	450	Gen 3-Нестимулир +TIL 1:3	19.738	13.255	20.614	17.869	43.28
	0.044	0.042	0.044	0.042	0.043	0.041	0.042	0.043	0.042	0.042	0.041	0.042	570	Gen 3-Нестимулир +TIL 1:9	13.875	31.096	19.718	21.563	
D	0,533	0.509	0.516	0.259	0.243	0.229	0.073	0.067	0.077	0.069	0.07	0.068	Дельта	Gen 3-Нестимулир +TIL 1:27	0.172	<0.000	33.321	16.7465	
	129,057	121,737	123,877	48,276	43,863	39,927	<0,000	<0,000	0,74	<0,000	<0,000	<0,000	Концентрация	Gen 3-Нестимулир +TIL 1:81	77.18	171.958	92.74	35.4743333	
				3910,387	3552,941	3234,126	<0,000	<0,000	59,939	<0,000	<0,000	<0,000	Кратность разведения						
E	0.361	0.35	0.346	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.143	0.135	0.145	0.115	0.112	0.11	450	Gen 2-Контр.со средой Стимул+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	0.00
	0.042	0.042	0.042	0.007	0.007	0.007	0.041	0.042	0.042	0.041	0.043	0.041	570	Gen 2-Контр.со средой Стимул+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	#DIV/0!	
	0.319	0.309	0.304	?????	?????	?????	0.102	0.093	0.103	0.074	0.069	0.068	Дельта						
	65.323	62.395	61.049	?????	?????	?????	6.579	4.418	6.871	0.076	<0.000	<0.000	Концентрация						
				?????	?????	?????	19.738	13.255	20.614	0.228	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
F	0.237	0.233	0.239	3.925	3.675	3.746	0.122	0.144	0.125	0.114	0.112	0.111	450	Gen 2-Контр.со средой Стимул. +TIL 1:3	0.228	<0.000	<0.000	0.228	0.11
	0.042	0.043	0.042	0.057	0.057	0.055	0.041	0.065	0.042	0.041	0.041	0.042	570	Gen 2-Контр.со средой Стимул. +TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0	
	0.195	0.19	0.197	3.868	3.618	3.691	0.081	0.089	0.084	0.073	0.071	0.069	Дельта						
	30.739	29.388	31.253	1464.87	1491.325	1424.683	1.542	3.455	2.191	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация						
				13183.83	13421.93	12822.14	13.875	31.096	19.718	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
G	0.162	0.173	0.183	1.922	1.957	1.765	0.115	0.115	0.121	0.114	0.111	0.114	450	Gen 2-Контр.со средой Нестимул.+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	0.00
	0.044	0.041	0.042	0.047	0.048	0.044	0.042	0.041	0.042	0.041	0.041	0.043	570	Gen 2-Контр.со средой Нестимул.+TIL 1:9	<0.000	<0.000	<0.000	0	
	0.138	0.132	0.141	1.875	1.909	1.716	0.073	0.073	0.079	0.073	0.07	0.07	Дельта						
	15.598	14.006	16.321	601.156	618.525	540.232	0.006	<0.000	1.234	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация						
				16231.22	16700.18	14586.27	0.172	<0.000	33.321	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
H	0.121	0.117	0.122	0.837	0.857	0.794	0.119	0.125	0.123	0.119	0.12	0.112	450	Gen 3-Контр.со средой Нестимул+TIL 1:3	<0.000	<0.000	<0.000	0	1.53
	0.045	0.042	0.047	0.043	0.045	0.043	0.041	0.041	0.043	0.045	0.044	0.042	570	Gen 3-Контр.со средой Нестимул.+TIL 1:9	1.357	4.779	<0.000	3.068	
	0.076	0.075	0.074	0.793	0.812	0.75	0.078	0.083	0.079	0.074	0.076	0.071	Дельта						
	0.635	0.408	0.17	211.613	217.755	197.622	0.953	2.123	1.256	0.151	0.531	<0.000	Концентрация						
				17140.68	16738.2	16007.4	77.18	171.968	101.73	1.357	4.779	<0.000	Кратность разведения						

Фиг. 24B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-MC	2A-MC	2A-MC	2A-Нестим.	2A-Нестим.	2A-Нестим.	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	KP*
B	STD2	STD2	STD2	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-MC	2A-MC	2A-MC	2A-Нестим.	2A-Нестим.	2A-Нестим.	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	KP*
C	STD3	STD3	STD3	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-MC	2A-MC	2A-MC	2A-Нестим.	2A-Нестим.	2A-Нестим.	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	27	27	27	KP*
D	STD4	STD4	STD4	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-MC	2A-MC	2A-MC	2A-Нестим.	2A-Нестим.	2A-Нестим.	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	81	81	81	KP*
E	STD5	STD5	STD5	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-MC	2B-MC	2B-MC	ID лунки
	62,5	62,5	62,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	KP*
F	STD6	STD6	STD6	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-MC	2B-MC	2B-MC	ID лунки
	31,3	31,3	31,3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	KP*
G	STD7	STD7	STD7	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-MC	2B-MC	2B-MC	ID лунки
	15,6	15,6	15,6	27	27	27	27	27	27	27	27	27	KP*
H	STD8	STD8	STD8	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2A-ГРАН+TIL	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-Нестим.	2B-MC	2B-MC	2B-MC	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	81	81	81	KP*
													* Концентрация/
24,1													
24,1													

Фиг. 25A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						Средн.	Средн.
A	2.419	2.231	2.274	3.051	3.123	3.136	0.079	0.079	0.081	0.18	0.198	0.191	450	2A-гран. +TIL 1:3					
	0.048	0.049	0.049	0.052	0.052	0.052	0.042	0.042	0.043	0.042	0.043	0.042	570	2A-гран. +TIL 1:9	4656.178	5074.253	5029.349	4919.927	5124.412
	2.071	2.182	2.224	3	3.071	3.084	0.037	0.037	0.037	0.1338	0.156	0.149	Дельта	2A-гран. +TIL 1:27	4916.763	5266.064	5189.955	5124.261	
	951.995	1012.581	1035.454	1479.442	>1500.000	>1500.000	0.379	0.287	0.472	37.604	44.509	41.927	[Концентрация]	2A-гран. +TIL 1:81	5249.956	5464.506	5272.686	5329.049	
				4438.326	>4500.000	>4500.000	1.137	0.861	1.417	112.812	133.527	125.78	Кратность разведения	2B-гран. +TIL 1:3	?????	?????	?????	#DIV/0!	
B	1.221	1.22	1.252	1.265	1.361	1.352	0.077	0.077	0.077	0.109	0.115	0.114	450	2B-гран. +TIL 1:9				#DIV/0!	
	0.046	0.046	0.046	0.046	0.047	0.047	0.042	0.044	0.042	0.042	0.043	0.042	570	2B-гран. +TIL 1:27	15284.891	13019.2	16306.887	14870.33	15061.77
	1.175	1.174	1.206	1.219	1.314	1.304	0.035	0.033	0.035	0.067	0.072	0.072	Дельта	2B-гран. +TIL 1:81	16086.64	13205.761	16467.237	15253.21	
	496.244	495.812	511.027	517.353	563.806	558.817	<0.000	<0.000	<0.000	10.74	12.637	12.564	[Концентрация]						
				4656.178	5074.253	5029.349	<0.000	<0.000	<0.000	96.66	113.737	113.077	Кратность разведения	2A-Нестимул. +TIL 1:3	112.812	133.527	125.78	124.0397	107.374
C	0.677	0.681	0.681	0.531	0.563	0.555	0.075	0.074	0.075	0.087	0.096	0.091	450	2A-Нестимул. +TIL 1:9	96.66	113.737	113.077	107.8247	
	0.043	0.044	0.044	0.044	0.045	0.043	0.042	0.042	0.042	0.042	0.045	0.042	570	2A-Нестимул. +TIL 1:27	76.848	131.834	113.974	107.552	
	0.634	0.637	0.637	0.488	0.518	0.511	0.033	0.032	0.033	0.045	0.05	0.049	Дельта	2A-Нестимул. +TIL 1:81	71.65	82.102	116.487	90.07967	
	245.876	247.384	247.428	182.102	195.039	192.221	<0.000	<0.000	<0.000	2.846	4.883	4.221	[Концентрация]						
				4916.763	5266.064	5189.955	<0.000	<0.000	<0.000	76.848	131.834	113.974	Кратность разведения	2B-Нестимул. +TIL 1:3	317.235	324.939	224.765	288.9797	236.1614
D	0.406	0.405	0.407	0.251	0.257	0.25	0.075	0.075	0.077	0.082	0.081	0.084	450	2B-Нестимул. +TIL 1:9	285.917	302.211	210.37	266.166	
	0.044	0.043	0.044	0.044	0.043	0.042	0.042	0.043	0.043	0.044	0.042	0.044	570	2B-Нестимул. +TIL 1:27	205.324	161.226	93.466	153.3387	
	0.363	0.362	0.363	0.207	0.214	0.208	0.033	0.032	0.035	0.039	0.039	0.04	Дельта	2B-Нестимул. +TIL 1:81					
	128.798	128.379	128.798	64.814	67.463	65.095	<0.000	<0.000	<0.000	0.885	1.014	1.438	[Концентрация]						
				5249.956	5464.506	5272.686	<0.000	<0.000	<0.000	71.65	82.102	116.487	Кратность разведения	2A-Контр. со ср. 1:3	1.137	0.861	1.417	1.138333	1.138778
E	0.244	0.241	0.241	OVRFLW	OVRFLW	OVRFLW	0.35	0.356	0.275	0.078	0.079	0.079	450	2A-Контр. со ср.1:9					
	0.042	0.042	0.042	0.067	0.063	0.066	0.043	0.043	0.043	0.042	0.042	0.043	570	2A-Контр. со ср.1:27					
	0.201	0.199	0.199	?????	?????	?????	0.307	0.314	0.232	0.036	0.036	0.036	Дельта	2A-Контр. со ср.1:81					
	65.323	61.493	61.533	?????	?????	?????	105.745	108.313	74.922	0.079	0.079	<0.000	[Концентрация]						
				?????	?????	?????	317.235	324.939	224.765	0.237	0.237	<0.000	Кратность разведения	2B-Контр. со ср.1:3	0.237	0.953	<0.000	0.595	1.47425
F	0.166	0.165	0.161	3.24	2.928	3.224	0.165	0.17	0.146	0.078	0.079	0.078	450	2B-Контр. со ср.1:9	0.457	4.25	<0.000	2.3535	
	0.042	0.043	0.043	0.055	0.053	0.055	0.043	0.042	0.045	0.042	0.042	0.042	570	2B-Контр. со ср.1:27					
	0.124	0.122	0.119	3.185	2.775	3.169	0.123	0.128	0.101	0.036	0.037	0.035	Дельта	2B-Контр. со ср.1:81					
	31.999	31.384	30.079	>1500.000	1346.731	>1500.000	31.769	33.579	23.374	0.051	0.472	<0.000	[Концентрация]						
				>13500.000	12120.579	>13500.000	285.917	302.211	210.37	0.457	4.25	<0.000	Кратность разведения						
G	0.122	0.119	0.117	1.371	1.154	1.448	0.102	0.097	0.092	0.072	0.072	0.07	450						
	0.043	0.042	0.043	0.052	0.048	0.052	0.043	0.044	0.045	0.043	0.045	0.043	570						
	0.078	0.076	0.074	1.319	1.106	1.396	0.058	0.054	0.046	0.029	0.028	0.027	Дельта						
	14.956	14.181	13.334	566.107	482.193	603.959	7.605	5.971	3.462	<0.000	<0.000	<0.000	[Концентрация]						
				15284.891	13019.2	16306.887	205.324	161.226	93.466	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						
H	0.077	0.084	0.077	0.572	0.489	0.583	0.098	0.082	0.086	0.074	0.073	0.07	450						
	0.042	0.042	0.042	0.046	0.045	0.046	0.049	0.043	0.043	0.043	0.043	0.043	570						
	0.036	0.042	0.036	0.526	0.443	0.537	0.05	0.038	0.043	0.031	0.03	0.027	Дельта						
	<0.000	2.136	0.023	198.6	163.034	203.299	4.534	0.756	2.305	<0.000	<0.000	<0.000	[Концентрация]						
				16086.64	13205.761	16467.237	367.254	61.271	186.666	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения						

Фиг. 25B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12						
A	STD1 2000	STD1 2000	STD1 2000	Gen 3-D7 1 запуск	Gen 3-D7 1запуск	Gen 3-D7 1запуск	Gen 3-D7 2 запуск	Gen 3-D7 2 запуск	Gen 3-D7 2 запуск				ID лунки КР*					
B	STD2 1000	STD2 1000	STD2 1000	Gen 3-D11 1 запуск	Gen 3-D11 1запуск	Gen 3-D11 1 запуск	Gen 3-D11 2 запуск	Gen 3-D11 2 запуск	Gen 3-D11 2 запуск				ID лунки КР*					
C	STD3 500	STD3 500	STD3 500	Gen 3-D16 1запуск	Gen 3-D16 1 запуск	Gen 3-D16 1 запуск	Gen 3-D16 2 запуск	Gen 3-D16 2 запуск	Gen 3-D16 2 запуск				ID лунки КР*					
D	STD4 250	STD4 250	STD4 250	Gen 2-D11 1запуск	Gen 2-D11 1запуск	Gen 2-D11 1 запуск	Gen 2-D11 2 запуск	Gen 2-D11 2 запуск	Gen 2-D11 2 запуск				ID лунки КР*					
E	STD5 125	STD5 125	STD5 125	Gen 2-D16 1запуск	Gen 2-D16 1запуск	Gen 2-D16 1запуск	Gen 2-D16 2 запуск	Gen 2-D16 2 запуск	Gen 2-D16 2 запуск				ID лунки КР*					
F	STD6 62,5	STD6 62,5	STD6 62,5	Gen 2-D22 1запуск	Gen 2-D22 1запуск	Gen 2-D22 1запуск	Gen 2-D22 2 запуск	Gen 2-D22 2 запуск	Gen 2-D22 2 запуск				ID лунки КР*					
G	STD7 31,3	STD7 31,3	STD7 31,3	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.				ID лунки КР*					
H	STD8 0	STD8 0	STD8 0	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.				ID лунки КР*					
22													* Концентрация/Кратность разведения					
22																		

Фиг. 26A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.223 0.052 2.171	2.297 0.052 2.246	2.239 0.051 2.188	0.218 0.043 0.175	0.22 0.042 0.177	0.215 0.043 0.172	0.187 0.044 0.143	0.187 0.043 0.145	0.184 0.051 0.133			
	1970.541	2046.905	1987.758	124.53	126.082	121.662	99.302	100.904	92.083			
B	1.095 0.047 1.048	1.281 0.046 1.234	1.276 0.047 1.229	0.415 0.043 0.372	0.412 0.043 0.369	0.435 0.043 0.393	0.394 0.043 0.351	0.392 0.044 0.348	0.356 0.044 0.312			
	877.734	1051.728	1047.027	282.4	280.328	299.854	264.954	262.893	233.453			
C	0.683 0.045 0.638	0.683 0.044 0.639	0.68 0.044 0.637	0.379 0.043 0.336	0.372 0.043 0.33	0.376 0.043 0.333	0.356 0.043 0.313	0.338 0.043 0.295	0.33 0.043 0.287			
	510.008	510.619	508.261	252.774	247.768	250.557	233.9443	219.211	212.888			
D	0.37 0.043 0.328	0.38 0.045 0.335	0.382 0.043 0.338	0.162 0.046 0.116	0.156 0.042 0.114	0.177 0.042 0.135	0.155 0.043 0.112	0.15 0.044 0.106	0.149 0.043 0.106			
	246.046	252.035	254.91	79.199	77.702	93.523	76.431	71.588	71.737			
E	0.216 0.043 0.173	0.219 0.043 0.176	0.22 0.045 0.175	0.235 0.044 0.191	0.227 0.043 0.185	0.228 0.043 0.185	0.253 0.048 0.205	0.231 0.045 0.186	0.222 0.045 0.177			
	122.514	124.995	123.909	136.754	131.526	131.682	147.807	132.695	125.539			
F	0.137 0.047 0.089	0.132 0.043 0.089	0.133 0.044 0.089	0.21 0.043 0.166	0.227 0.044 0.183	0.216 0.044 0.172	0.238 0.043 0.195	0.233 0.043 0.19	0.253 0.045 0.207			
	59.482	58.969	59.116	117.564	130.125	121.895	139.491	135.738	149.459			
G	0.088 0.042 0.046	0.088 0.043 0.046	0.089 0.043 0.046	2.265 0.05 2.215	2.329 0.05 2.28	2.22 0.049 2.171	2.225 0.051 2.174	2.175 0.052 2.122	2.239 0.053 2.186			
	28.375	28.237	28.514	2014.9	2081.651	1970.439	1973.799	1920.845	1986.127			
H	0.05 0.043 0.007	0.048 0.042 0.006	0.048 0.041 0.007	2.272 0.05 2.223	2.267 0.05 2.217	2.213 0.052 2.161	2.244 0.057 2.187	2.254 0.052 2.202	2.248 0.059 2.188			
	3.1	2.399	2.573	2023.073	2016.943	1960.16	1986.84	2002.036	1988.165			

450	Коэфф. разведения = 100							
570								
Дельта		Регистр. A	Регистр. B	Регистр. C	Регистр. A*100	Регистр. B*100	Регистр. C*100	Средн.
Концентрация	Gen 3 Иниц. REP 1 запуск	124.530	126.082	121.662	12453.0	12608.2	12166.2	12409.1
450	Gen 3 Масштаб. 1 запуск	282.400	280.328	299.854	28240.0	28032.8	29985.4	28752.7
570	Gen 3 Сбор 1 запуск	252.774	247.768	250.557	25277.4	24776.8	25055.7	25036.6
Дельта								
Концентрация	Gen 2 Иниц. REP 1 запуск	79.199	77.702	93.523	7919.9	7770.2	9352.3	8347.5
450	Gen 2 Масштаб. 1 запуск	136.754	131.526	131.682	13675.4	13152.6	13168.2	13332.1
570	Gen 2 Сбор 1 запуск	117.564	130.125	121.895	11756.4	13012.5	12189.5	12319.5
Дельта								
Концентрация								
450	Gen 3 Иниц. REP 2 запуск	99.302	100.904	92.083	9930.2	10090.4	9208.3	9743.0
570	Gen 3 Масштаб. 2 запуск	264.954	262.893	233.453	26495.4	26289.3	23345.3	25376.7
Дельта	Gen 3 Сбор 2 запуск	233.943	219.211	212.888	23394.3	21921.1	21288.8	22201.4
Концентрация								
450	Gen 2 Иниц. REP 2 запуск	76.431	71.588	71.737	7643.1	7158.8	7173.7	7325.2
570	Gen 2 Масштаб. 2 запуск	147.807	132.695	125.539	14780.7	13269.5	12553.9	13534.7
Дельта	Gen 2 Сбор 2 запуск	139.491	135.738	149.459	13949.1	13573.8	14945.9	14156.3
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								

Фиг. 26B

№ образца	Описание	Глюкоза	Лактат (г/л)	Аммиак (ммоль/л)	Глутамин (ммоль/л)	Glutamax (ммоль/л)	Glutamax-Глутамин (ммоль/л)
1	Gen 2 – Инициация Rep, Первый раунд, #L4054	1,78	0,14	2,16	1,56	1,71	0,16
2	Gen 2 – Масштабирование, Первый раунд, #L4054	1,36	0,89	1,40	1,76	1,90	0,15
3	Gen 2 – Сбор, Первый раунд, #L4054	0,83	1,68	2,46	1,69	1,85	0,17
4	Gen 3 – Инициация Rep, Первый раунд, #L4054	1,68	0,29	1,76	2,11	2,29	0,18
5	Gen 3 – Масштабирование, Первый раунд, #L4054	1,28	0,94	1,64	1,70	1,87	0,16
6	Gen 3 – Сбор, Первый раунд, #L4054	1,07	1,53	2,23	1,39	1,54	0,14
7	Gen 2 – Инициация Rep, Второй раунд, #L4055	1,91	0,08	2,29	1,60	1,74	0,14
8	Gen 2 – Масштабирование, Второй раунд, #L4055	1,61	0,77	1,40	1,78	1,93	0,15
9	Gen 2 – Сбор, Второй раунд, #L4055	0,85	1,86	2,46	1,39	1,55	0,16
10	Gen 3 – Инициация Rep, Второй раунд, #L4055	1,77	0,18	1,74	2,06	2,23	0,17
11	Gen 3 – Масштабирование, Второй раунд, #L4055	1,60	0,72	1,54	1,68	1,84	0,15
12	Gen 3 – Сбор, Второй раунд, #L4055	1,44	1,32	2,07	1,79	1,95	0,16

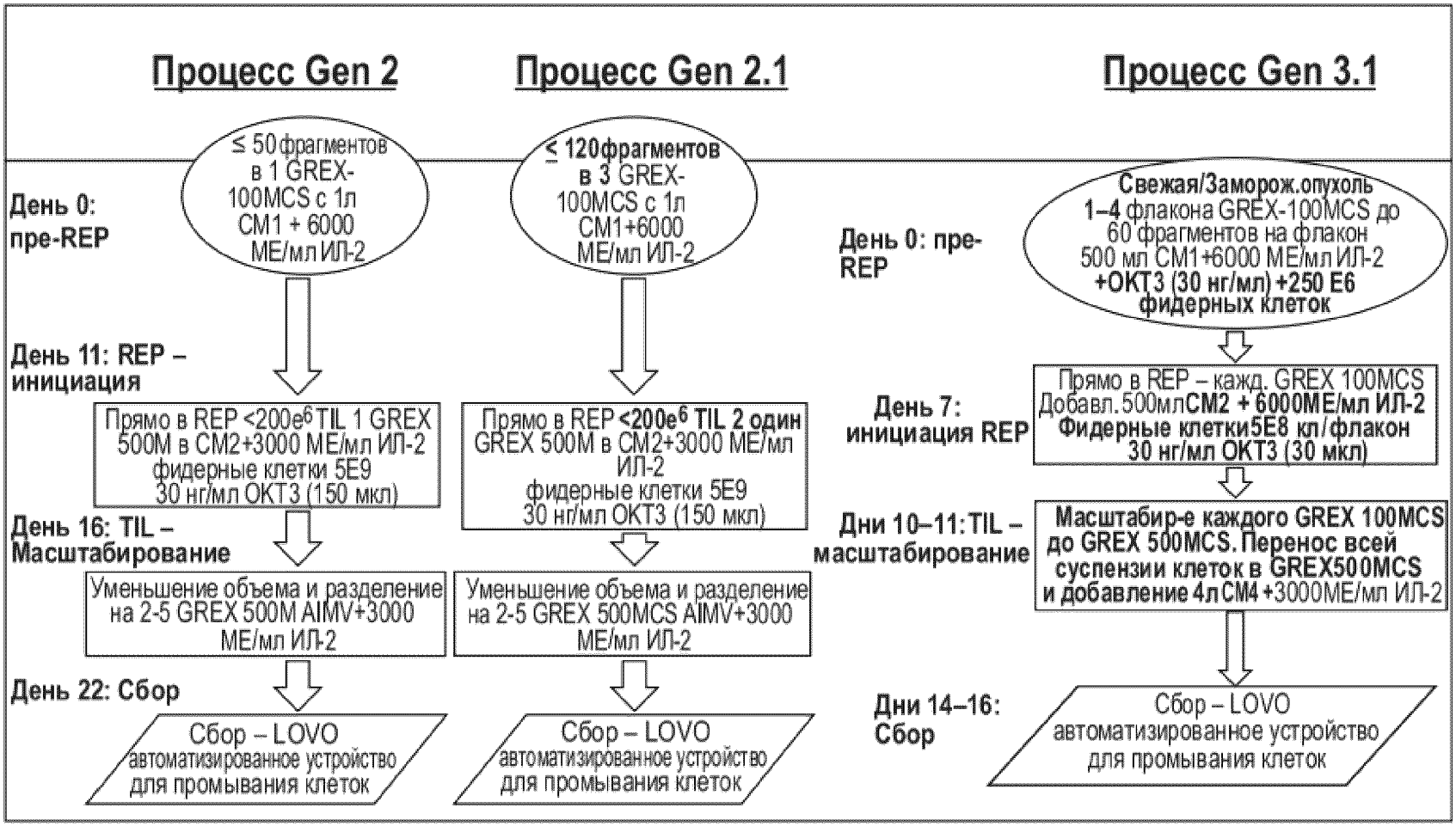
Фиг. 27

Фиг. 28

	SFIL	S/L/13011 |Геометр.	S/L/Pt | Геометр. Среднее (FL03-A)
Al gen2L4054 (-)	Al gen2L4054 (-).fcs	34,5	3,24
A2gen2L4054 (-)	A2 gen2L4054 (-).fcs	34	3,19
A3 gen2L4054 (+)	A3gen2L4054 (+).fcs	1834	70,6
A4gen2L4054 (+)	A4gen2L4054 (+).fcs	1872	70,3
A5 gen2L4055 (-)	A5 gen2L4055 (-).fcs	31,9	4,23
A6 gen2L4055 (-)	A6 gen2L4055 (-).fcs	32,4	4,87
A7 gen2L4055 (+)	A7 gen2L4055 (+).fcs	1941	88,7
A8 gen2L4055 (+)	A8gen2L4055 (+).fcs	1933	91,1
Bl gen3L4054 (-)	Bl gen3L4054 (-).fcs	31,2	3,45
B2 gen3L4054 (-)	B2 gen3L4054 (-).fcs	31,9	3,39
B3 gen3L4054 (+)	B3gen3L4054 (+).fcs	2016	61,3
B4 gen3L4054 (+)	B4 gen3L4054 (+).fcs	2014	76,2
B5 gen3L4055 (-)	B5 gen3L4055 (-).fcs	33,7	6,76
B6 gen3L4055 (-)	B6 gen3L4055 (-).fcs	35,4	6,7
B7 gen3L4055 (+)	B7 gen3L4055 (+).fcs	2158	99,4
B8 gen3L4055 (+)	B8 gen3L4055 (+).fcs	1938	99,5
Среднее	-	998	43,3
SD	-	999	41,3

Исследование	Образец	ID образца	Вид	Цепь	Риды	CDR3	Уник. CDR3	D50
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4054	59990	TRB	h	1181732	1181732	8915	0
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4054	59991	TRB	h	1145697	1145697	18130	0
20180511_Study1_FCA	Gen2-L4055	59987	TRB	h	1166465	1166465	12996	0,1
20180511_Study1_FCA	Gen3-L4055	59982	TRB	h	1059985	1059985	27246	0,9

Фиг. 29


Процесс Gen 2
Процесс Gen 2.1
Процесс Gen 3.1
День 0: пре-REP
≤ 50 фрагментов в 1 GREX-100MCS с 1л CM1 + 6000 МЕ/мл ИЛ-2
≤ 120 фрагментов в 3 GREX-100MCS с 1л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2
День 11: REP – инициация
Прямо в REP <200e6 TIL 1 GREX 500M в CM2+3000 МЕ/мл ИЛ-2 фидерные клетки 5E9 30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
Прямо в REP <200e6 TIL 2 один GREX 500M в CM2+3000 МЕ/мл ИЛ-2 фидерные клетки 5E9 30 нг/мл OKT3 (150 мкл)
День 16: TIL – Масштабирование
Уменьшение объема и разделение на 2-5 GREX 500M AIMV+3000 МЕ/мл ИЛ-2
Уменьшение объема и разделение на 2-5 GREX 500MCS AIMV+3000 МЕ/мл ИЛ-2
День 22: Сбор
Сбор – LOVO автоматизированное устройство для промывания клеток
Сбор – LOVO автоматизированное устройство для промывания клеток
День 0: пре-REP
Свежая/Заморож.опухоль 1–4 флакона GREX-100MCS до 60 фрагментов на флакон 500 мл CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2 +OKT3 (30 нг/мл) +250 E6 фидерных клеток
День 7: инициация REP
Прямо в REP – кажд. GREX 100MCS Добавл. 500мл CM2 + 6000МЕ/мл ИЛ-2 Фидерные клетки 5E8 кл/флакон 30 нг/мл OKT3 (30 мкл)
Дни 10–11: TIL – масштабирование
Масштабир-е каждого GREX 100MCS до GREX 500MCS. Перенос всей суспензии клеток в GREX500MCS и добавление 4л CM4 +3000МЕ/мл ИЛ-2
Дни 14–16: Сбор
Сбор – LOVO автоматизированное устройство для промывания клеток

Фиг. 30

ЭТАП	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0 Оптимизированный
Пре-REP – день 0	≤ 50 фрагментов/ 1 G-Rex 100MCS - **11 дней**	≤ 180 фрагментов/ 3 G-Rex, Предварит. пригот. нагретая среда CM1 100MCS - **11 дней**	**Свежая или замороженная опухоль** целая опухоль, ≤ 30 фрагментов - до 60 фрагментов на 1 G-Rex. 100MCS (до 4 G-Rex), Предварит. пригот. нагретая среда-**7 дней. пре-REP, 2,5 E8 фидерных клеток + OKT-3 (30нг/мл)**
Инициация REP	Прямо к REP- День 11- **<200 E6 TIL** 1 G-Rex 500MCS	Прямо к REP- День 11- **<200 E6 TIL** Предварит. пригот. нагретая CM2 в 1 G-Rex 500MCS	прямо к REP- День **7- все TIL- тот G-Rex 100MCS (100MCS до 4 GREX), Стандартная среда или среда с зад. составом (бессыв.). + 5 E8 фидерных клеток +OKT-3 (30нг/мл)**
Размножение TIL или масштабирование	1 - 5 G-REX 500MCS **Разделение - день 16**	2 - 5 G-REX 500MCS Предварит. пригот. нагретая CM4 **Разделение - день 16**	Перенос из G-REX 100MCS суспензии TIL в G-REX 500MCS, до 4 GREX 500 MCS- Стандартная среда или среда с заданным составом (бессыв.) **Масштабирование на 10 или 11 день**
Сбор	**Сбор - день 22,** LOVO- авт. устр. для промывания клеток	**Сбор - день 22,** LOVO - авт. устр. для (5 циклов промыв-я)	**Сбор - день 14 или 16** LOVO- автоматизированное устройство для промывания клеток (5 цикло промывания)
Итоговый состав	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ-2, CS10/LN_2,несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ-2, CS10/LN_2,несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ-2, CS10/LN_2,несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дня**	**22 дня**	**16 дней**

Фиг. 31

День процесса	Условия	Gen 3.1
День 0 – инициация пре-REP	Среда CM1	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (30 нг/мл)	+
	Фидерные клетки (250 E+06)	+

День процесса	Условия	Gen 3.1
День 7 – инициация REP	Среда CM2	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (30 нг/мл), добавленный на 7 день	+
	Фидерные клетки ,добавленные на 7 день	500 E06
	Всего фидерных клеток к указанному дню	750 E+06

День процесса	Условия	Gen 3.1
День 9-11 – Масштабирование	Из G-REX 100MCS суспензию TIL переносят в 1 G-REX 500MCS (до 3 GREX 500MCS)	Да
День 16 – Сбор	LOVO- автоматизированное устройство для промывания клеток	Да

Фиг. 32

Сравнение способов	Ключевые изменения процесса	Преимущество
Gen 2 : Gen 2.1	• Процесс начинают с двух флаконов, а не с одного • Разделение фидерного слоя для инициации REP между 2 флаконами G-Rex500MCS • Превaрительное приготовление и подогревание среды перед использованием	• Потенциальное удвоение итогового числа клеток (дозы) при большем репертуаре TIL) • Резервирование на протяжении всего процесса
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Свежая или замороженная опухоль • Процесс занимает 14-16 дней (вместо 22 дней) • Меньше общая толщина фидерного слоя в ходе процесса • Фидерный слой и OKT3 присутствуют на 0 день • REP начинают с фрагментами • 100MCS масштабируют до 500MCS • Масштабирование до нескольких пре-REP флаконов • Стандартные среды и среды с заданным составом (бессывороточные)	• Повышенная активность • Улучшенный фенотип • Меньшая продолжительность процесса • Меньшее тестирование реагентов • Сниженная изменчивость процесса • Заданные реагенты • Больший репертуар • Меньше загрязняющих примесей (фидерный слой) • Сравнимая или более высокая доза.

Фиг. 33

Сравнение способов	Ключевые изменения процесса	Требуемое усовершенст-вование	Критерии Успешности	Результат
Gen 2 : Gen 3.0	• 14–16 дней • Инициация REP фрагментами до 4 флакона. • Масштабиро-вание от 100MCS до 500MCS	• Повышенная активность • Улучшенный фенотип • Пониженная продолжительность процесса	• Повышенная активность по оценке ИФН-g ✓ • Сопоставимый фенотип ✓ • Сопоставимая доза ✓ • Сопоставимая чистота ✓ (фидерные клетки) • Сохранение клонального разнообразия ✓	• Повышенная активность относительно Gen2 • Улучшенная экспрессия CD28 на клетках CD8 • Макс. емкость флакона достигается к 16 дню при Gen 3.1 • Пониженное исп-е фидерных клеток • Повышенное разнообразие

Фиг. 34

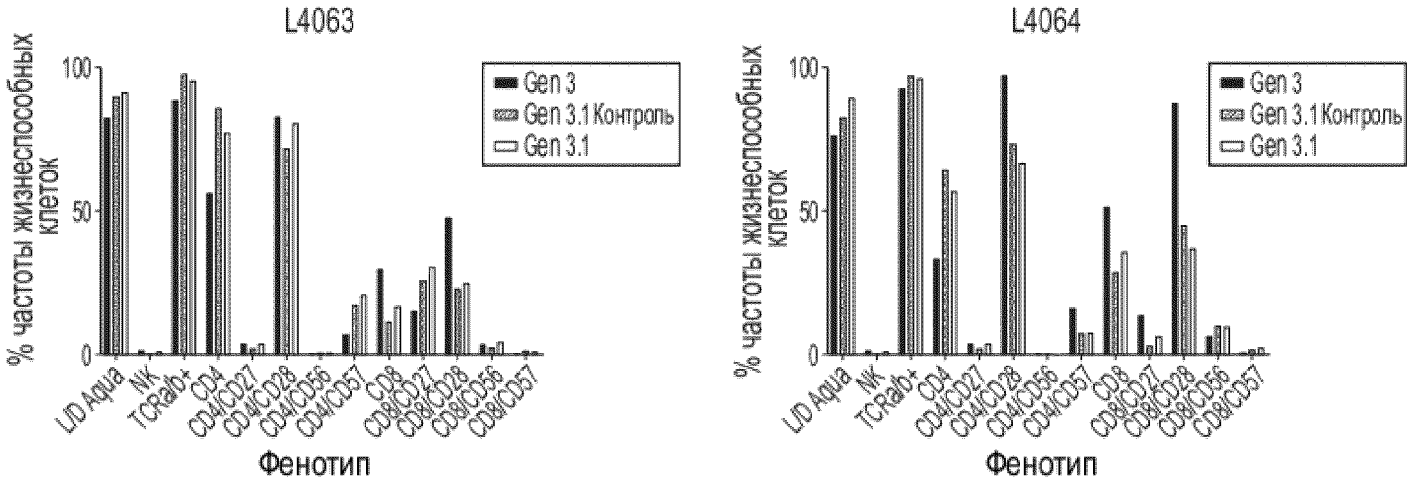
Способ (процесс)	Gen 2	Gen 3
L4054	Стандартная среда	Стандартная среда
L4055	Стандартная среда	Стандартная среда
M1085T	Стандартная среда	Стандартная среда

Способ (процесс)	Gen 3	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1
L4063	Стандартная среда	Стандартная среда	Стандартная среда
L4064	Среда с заданным составом	Среда с заданным составом	Среда с заданным составом

Стандартная среда:
пре-REP: CM1
инициация REP: CM2
Разведение или масштабирование: CM4

Среда с заданным составом:
CTS Optimizer (не содержащая сыворотки среда)
во все дни процесса

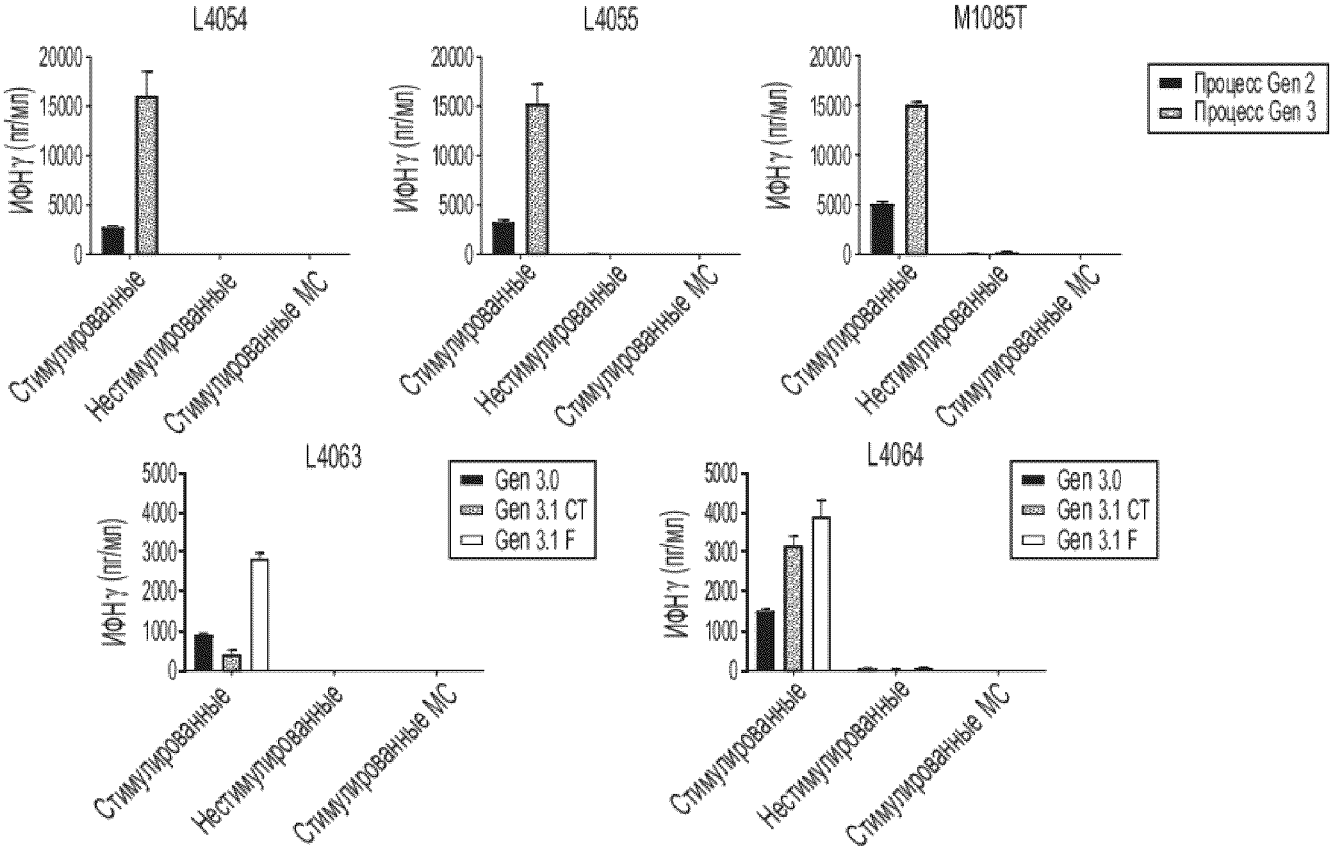
Фиг. 35



ID опухоли	Стандартная среда L4063			Среда с заданным составом L4064		
Процесс	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1
Число фрагментов	53	53	53	21	21	21

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в среде CTS Optimizer		
Процесс	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест.
Количество фрагментов	53	53	53	21	21	21
Среднее кол-во TVC на фрагмент	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
%жизнеспособности в момент сбора	79,53%	89,43%	94,80%	88,80%	81,90%	84,90%
Сбор TVC	7,26E+09	1,69E+10	1,87E+10 *	1,24E+10	1,59E+10	1,95E+10 *

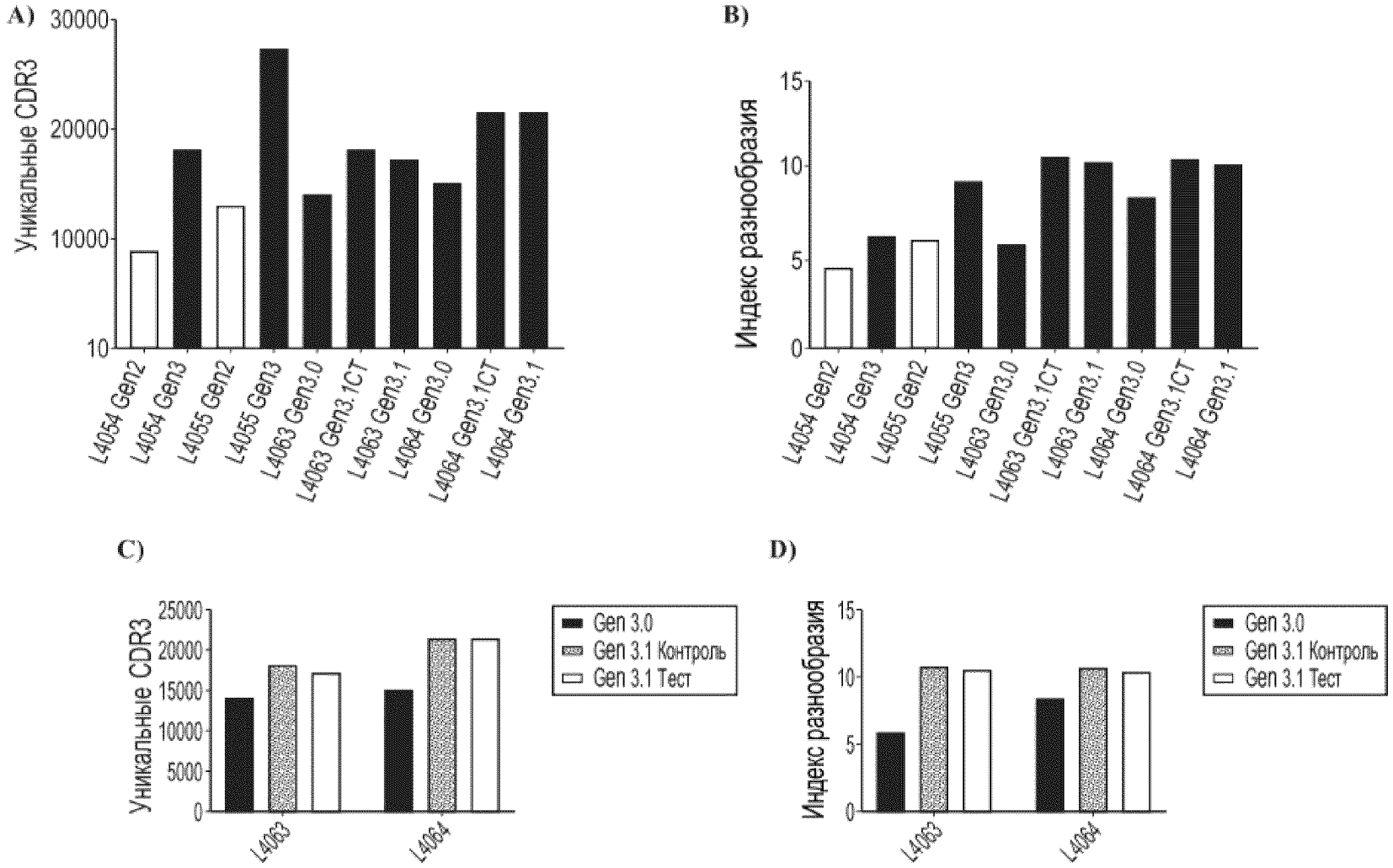
Фиг. 36



L4063- Стандартная среда : **L4064- Среда с заданным составом**

День процесса	Условия	Gen 3.0	Gen 3.1 CT (контроль)	Gen 3.1 F
День 0- до инициации REP	Среда CM1	500 мл	500 мл	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+	+	+
	OKT-3 (30 нг/мл)	-	+	+
	Фидеры (250 E+06)	-	-	+

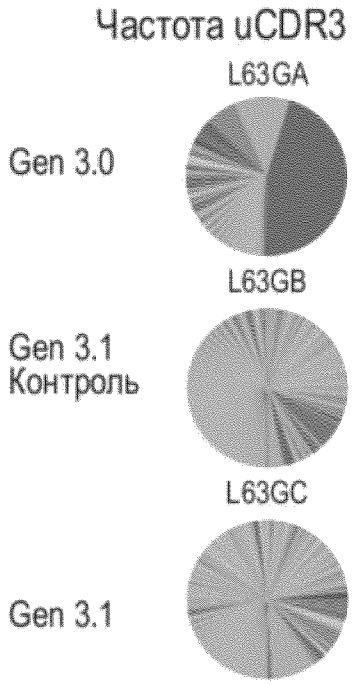
Фиг. 37


A)
Уникальные CDR3
30000
20000
10000
10
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
B)
Индекс разнообразия
15
10
5
0
L4054 Gen2
L4054 Gen3
L4055 Gen2
L4055 Gen3
L4063 Gen3.0
L4063 Gen3.1CT
L4063 Gen3.1
L4064 Gen3.0
L4064 Gen3.1CT
L4064 Gen3.1
C)
Уникальные CDR3
25000
20000
15000
10000
5000
0
L4063
L4064
Gen 3.0
Gen 3.1 Контроль
Gen 3.1 Тест
D)
Индекс разнообразия
15
10
5
0
L4063
L4064
Gen 3.0
Gen 3.1 Контроль
Gen 3.1 Тест

Фиг. 38

Условия на 0 день	Gen 3.0	Gen 3.1 (контроль)	Gen 3.1
Среда	500 мл	500 мл	500 мл
ИЛ-2 (6E+06)	+	+	+
ОКТ-3 (30 нг/мл)	-	+	+
Фидеры (250 E+06)	-	-	+

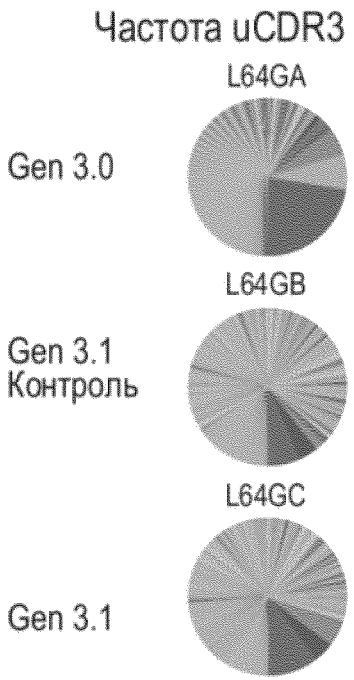
Кол-во uCDR3 (% перекр.)	Все uCDR3			Лидир-е 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1
Gen 3.0	14005	3240 (23)	2959 (21)	1105	1000 (90)	975 (88)
Gen 3.1 Контроль	-	18149	-	-	2438	-
Gen 3.1	-	-	17181	-	-	2332



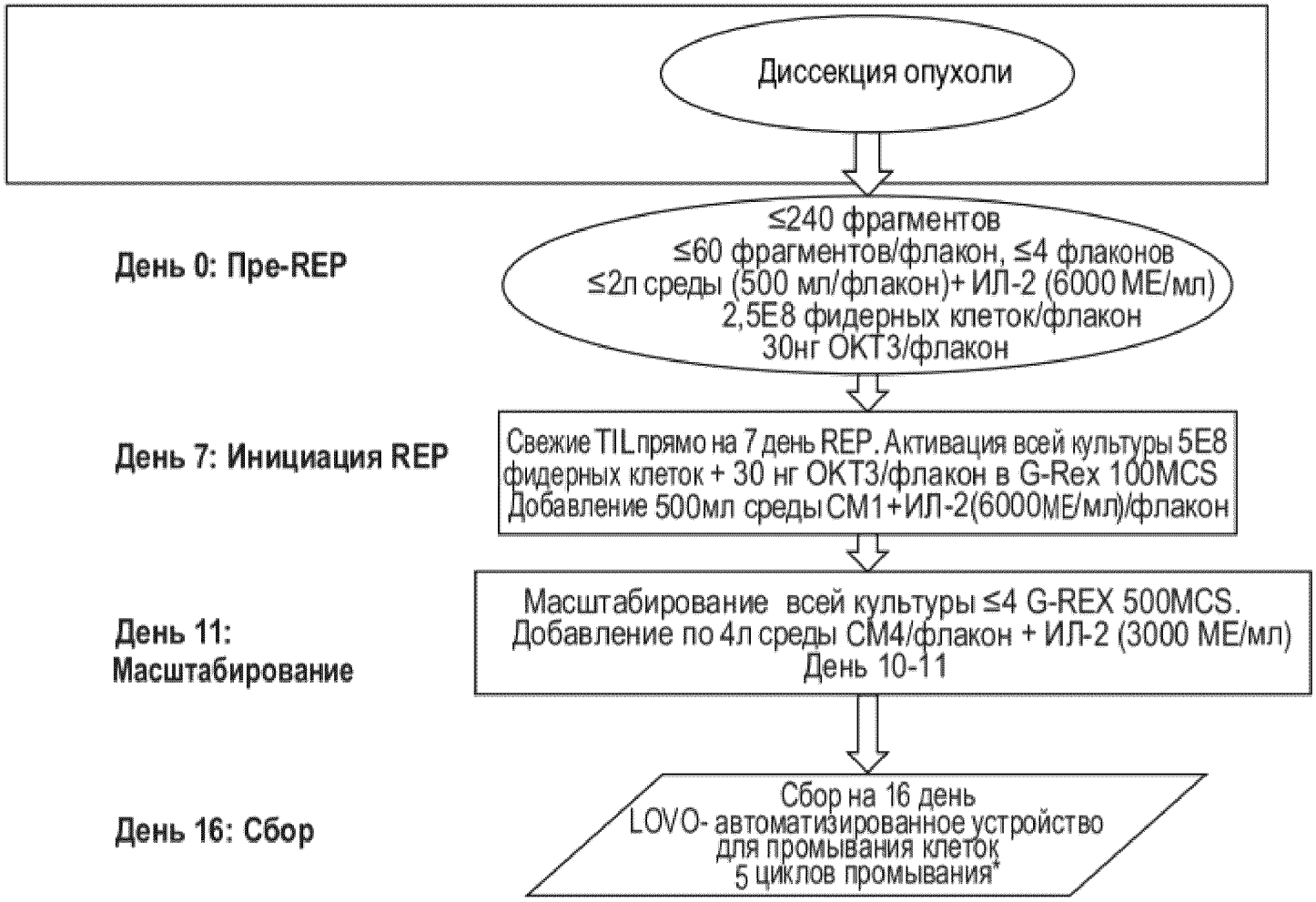
Фиг. 39

Условия на 0 день	Gen 3.0	Gen 3.1 (контроль)	Gen 3.1
Среда	500 мл	500 мл	500 мл
ИЛ-2 (6E+06)	+	+	+
ОКТ-3 (30 нг/мл)	-	+	+
Фидерные кл. (250 E+06)	-	-	+

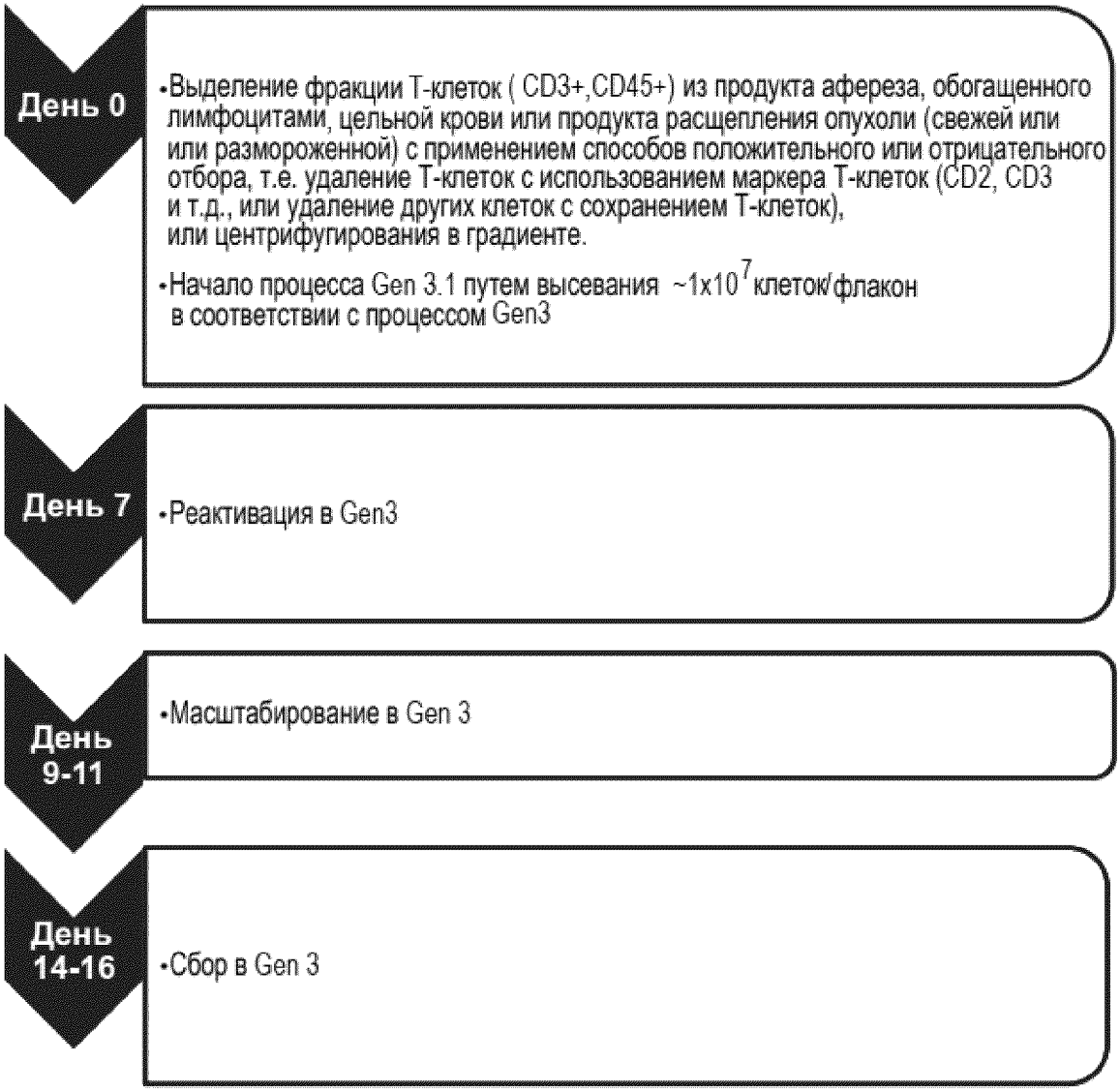
Кол-во uCDR3 (% Перекрыв.)	Все uCDR3			Лид. 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контр.	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1
Gen 3.0	15107	5486 (36)	5541 (37)	2479	2186 (88)	2163 (87)
Gen 3.1 Контроль	-	21460	-	-	3247	-
Gen 3.1	-	-	21503	-	-	3264



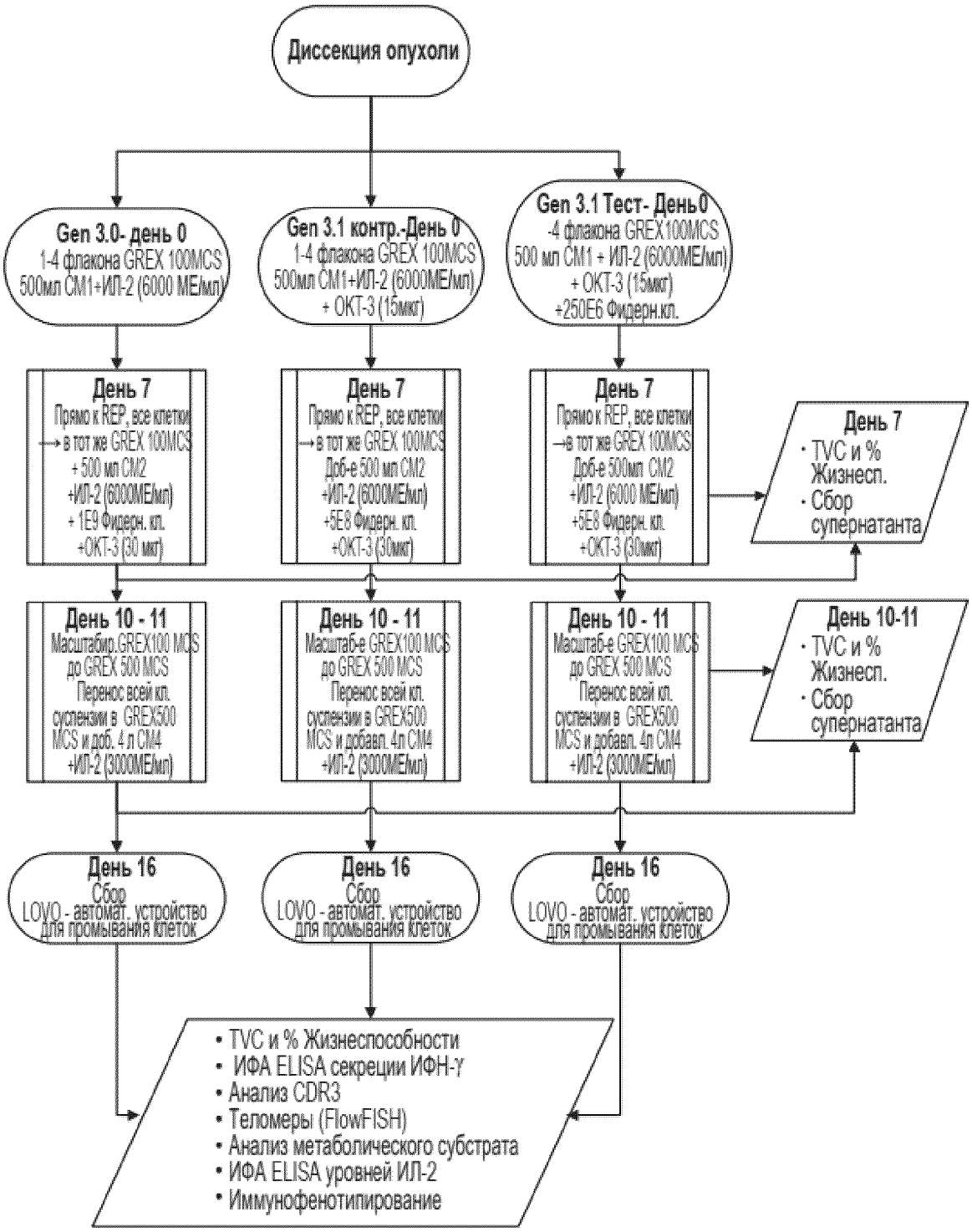
Фиг. 40


Диссекция опухоли
День 0: Пре-REP
≤240 фрагментов
≤60 фрагментов/флакон, ≤4 флаконов
≤2л среды (500 мл/флакон)+ ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
2,5E8 фидерных клеток/флакон
30нг OKT3/флакон
День 7: Инициация REP
Свежие TIL прямо на 7 день REP. Активация всей культуры 5E8 фидерных клеток + 30 нг OKT3/флакон в G-Rex 100MCS
Добавление 500мл среды CM1+ИЛ-2(6000МЕ/мл)/флакон
День 11: Масштабирование
Масштабирование всей культуры ≤4 G-REX 500MCS.
Добавление по 4л среды CM4/флакон + ИЛ-2 (3000 МЕ/мл)
День 10-11
День 16: Сбор
Сбор на 16 день
LOVO- автоматизированное устройство для промывания клеток
5 циклов промывания*

Фиг. 41


День 0
•Выделение фракции Т-клеток (CD3+,CD45+) из продукта афереза, обогащенного лимфоцитами, цельной крови или продукта расщепления опухоли (свежей или или размороженной) с применением способов положительного или отрицательного отбора, т.е. удаление Т-клеток с использованием маркера Т-клеток (CD2, CD3 и т.д., или удаление других клеток с сохранением Т-клеток), или центрифугирования в градиенте.
•Начало процесса Gen 3.1 путем высевания ~1x10^7 клеток/флакон в соответствии с процессом Gen3
День 7
•Реактивация в Gen3
День 9-11
•Масштабирование в Gen 3
День 14-16
•Сбор в Gen 3

Фиг. 42


Диссекция опухоли
Gen 3.0- день 0
1-4 флакона GREX 100MCS
500мл СМ1+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
Gen 3.1 контр.-День 0
1-4 флакона GREX 100MCS
500мл СМ1+ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
+ ОКТ-3 (15мкг)
Gen 3.1 Тест- День 0
-4 флакона GREX100MCS
500 мл СМ1 + ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
+ ОКТ-3 (15мкг)
+250Е6 Фидерн.кл.
День 7
Прямо к REP, все клетки
→ в тот же GREX 100MCS
+ 500 мл СМ2
+ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
+ 1Е9 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30 мкг)
День 7
Прямо к REP, все клетки
→в тот же GREX 100MCS
Доб-е 500 мл СМ2
+ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
+5Е8 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30мкг)
День 7
Прямо к REP, все клетки
→в тот же GREX 100MCS
Доб-е 500мл СМ2
+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+5Е8 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30мкг)
День 7
· TVC и %
Жизнесп.
· Сбор
супернатанта
День 10 - 11
Масштабир.GREX100 MCS
до GREX 500 MCS
Перенос всей кл.
суспензии в GREX500
MCS и доб. 4 л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10 - 11
Масштаб-е GREX100 MCS
до GREX 500 MCS
Перенос всей кл.
суспензии в GREX500
MCS и добавл. 4л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10 - 11
Масштаб-е GREX100 MCS
до GREX 500 MCS
Перенос всей кл.
суспензии в GREX500
MCS и добавл. 4л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10-11
· TVC и %
Жизнесп.
· Сбор
супернатанта
День 16
Сбор
LOVO - автомат. устройство
для промывания клеток
День 16
Сбор
LOVO - автомат. устройство
для промывания клеток
День 16
Сбор
LOVO - автомат. устройство
для промывания клеток
• TVC и % Жизнеспособности
• ИФА ELISA секреции ИФН-γ
• Анализ CDR3
• Теломеры (FlowFISH)
• Анализ метаболического субстрата
• ИФА ELISA уровней ИЛ-2
• Иммунофенотипирование

Фиг. 43

День процесса	Условия	Gen 3.1 Тест
День 0- инициация пре-REP	Среда CM1	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (15 мкг)	+
	Фидерные клетки (250 E+06)	+

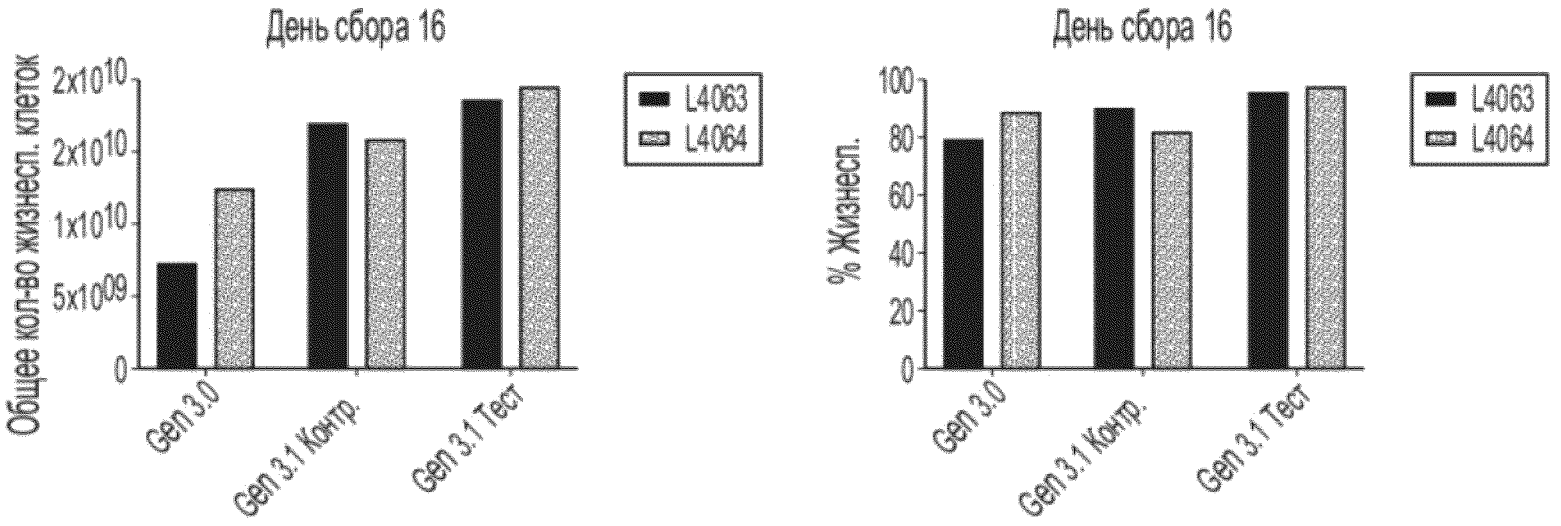
День процесса	Условия	Gen 3.1 Тест
День 7- инициация REP	Среда CM2	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+
	OKT-3 (30 мкг), добавл. на 7 день	+
	Фидерные клетки, добавл. на 7 день	500 E06
	Всего фидерных кл. на 7 день:	750 E+06

День процесса	Условия	Gen 3.1 Тест
День 9-11 - Масштабирование	Перенос суспензии TIL из G-REX 100MCS в 1 G-REX 500MCS (до 3 GREX 500MCS)	+
День 16 - Сбор	LOVO- автом. устр-во для промыв-я клеток	+

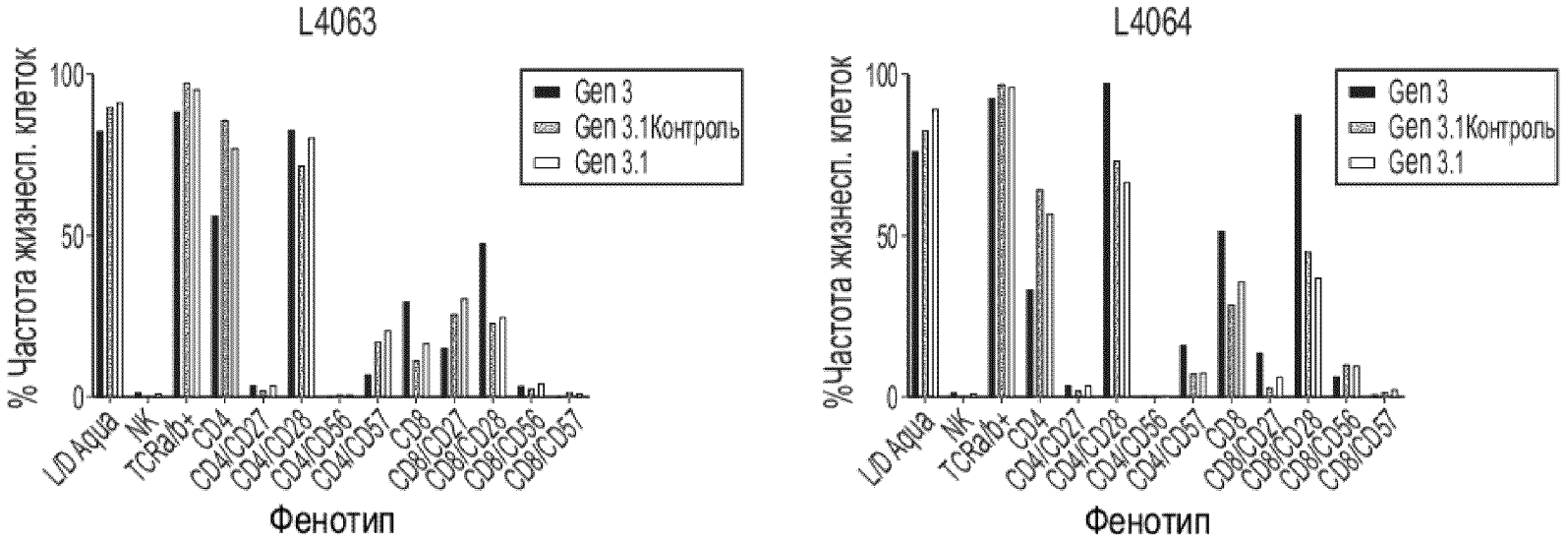
Фиг. 44

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в среде CTS Optimizer		
Процесс	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Кол-во фрагментов	53	53	53	21	21	21
Средн. TVC на фрагмент	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
% жизнеспос-ти при сборе	79,53%	89,43%	94,80%	88,80%	81,90%	84,90%
Сбор TVC	**7,26E+09**	**1,69E+10**	**1,87E+10 ***	**1,24E+10**	**1,59E+10**	**1,95E+10 ***

Фиг. 45

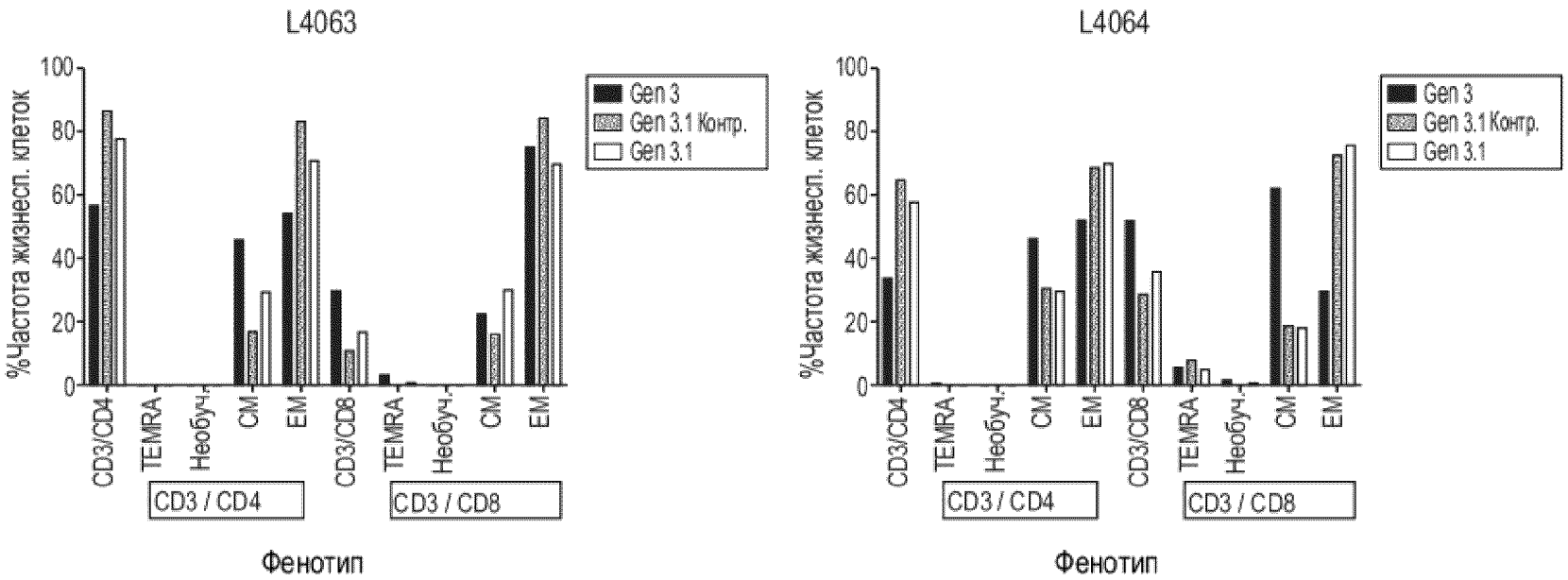

День сбора 16
Общее кол-во жизнесп. клеток
2x10^10
2x10^10
1x10^10
5x10^09
0
Gen 3.0
Gen 3.1 Контр.
Gen 3.1 Тест
L4063
L4064
День сбора 16
% Жизнесп.
100
80
60
40
20
0
Gen 3.0
Gen 3.1 Контр.
Gen 3.1 Тест
L4063
L4064

Фиг. 46

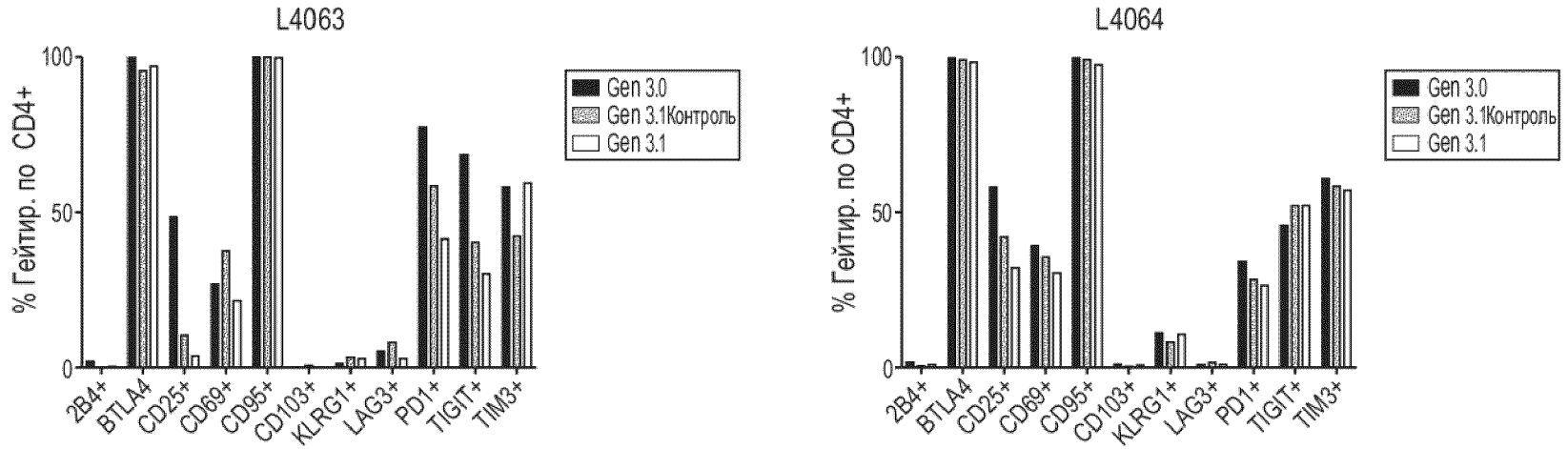


ID опухоли	L4063 - Стандартная среда			L4064 Среда с зад. составом		
Процесс	Gen 3.0	Gen 3.1 Контр.	Gen 3.1	Gen 3.0	Gen 3.1 Контр.	Gen 3.1
# фрагментов	53	53	53	21	21	21

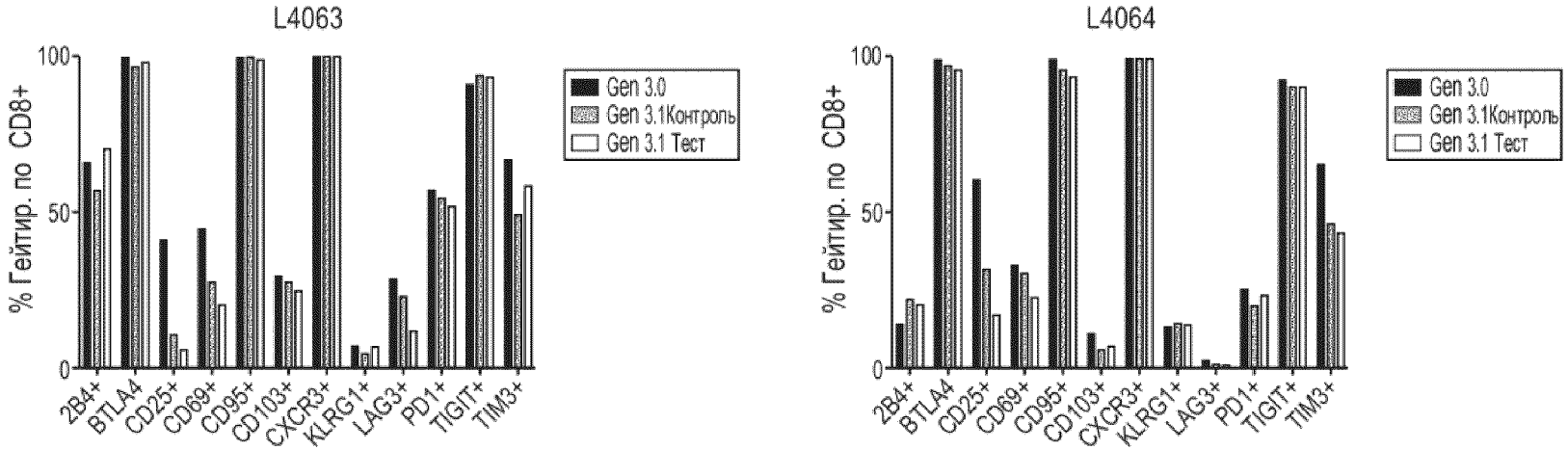
Фиг. 47


L4063
%Частота жизнесп. клеток
100
80
60
40
20
0
Gen 3
Gen 3.1 Контр.
Gen 3.1
CD3/CD4
TEMRA
Необуч.
CM
EM
CD3/CD8
TEMRA
Необуч.
CM
EM
CD3 / CD4
CD3 / CD8
Фенотип
L4064
%Частота жизнесп. клеток
100
80
60
40
20
0
Gen 3
Gen 3.1 Контр.
Gen 3.1
CD3/CD4
TEMRA
Необуч.
CM
EM
CD3/CD8
TEMRA
Необуч.
CM
EM
CD3 / CD4
CD3 / CD8
Фенотип

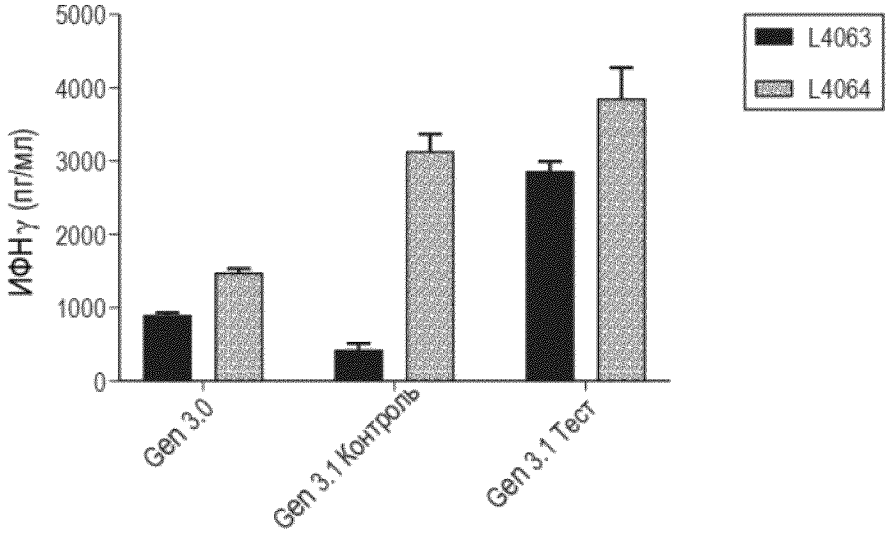
Фиг. 48


L4063
% Гейтир. по CD4+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 3.0
Gen 3.1Контроль
Gen 3.1
L4064
% Гейтир. по CD4+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 3.0
Gen 3.1Контроль
Gen 3.1

Фиг. 49

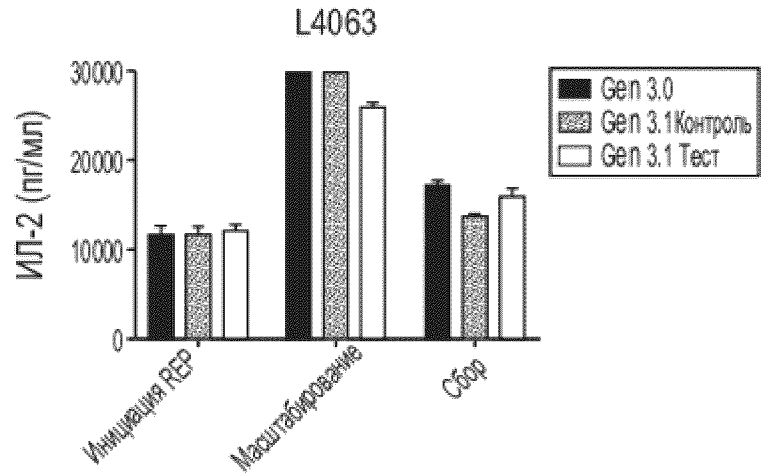

L4063
% Гейтир. по CD8+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 3.0
Gen 3.1Контроль
Gen 3.1 Тест
L4064
% Гейтир. по CD8+
100
50
0
2B4+
BTLA4
CD25+
CD69+
CD95+
CD103+
CXCR3+
KLRG1+
LAG3+
PD1+
TIGIT+
TIM3+
Gen 3.0
Gen 3.1Контроль
Gen 3.1 Тест

Фиг. 50

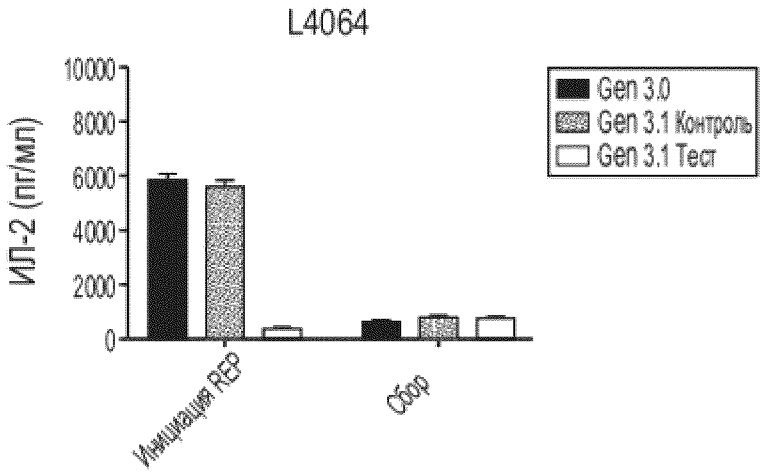


День процесса	Условия	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
День 0-инициация пре-REP	Среды CM1	500 мл	500 мл	500 мл
	ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)	+	+	+
	OKT-3 (30нг/мл)	-	+	+
	Фидерные клетки (250 E+06)	-	-	+

Фиг. 51



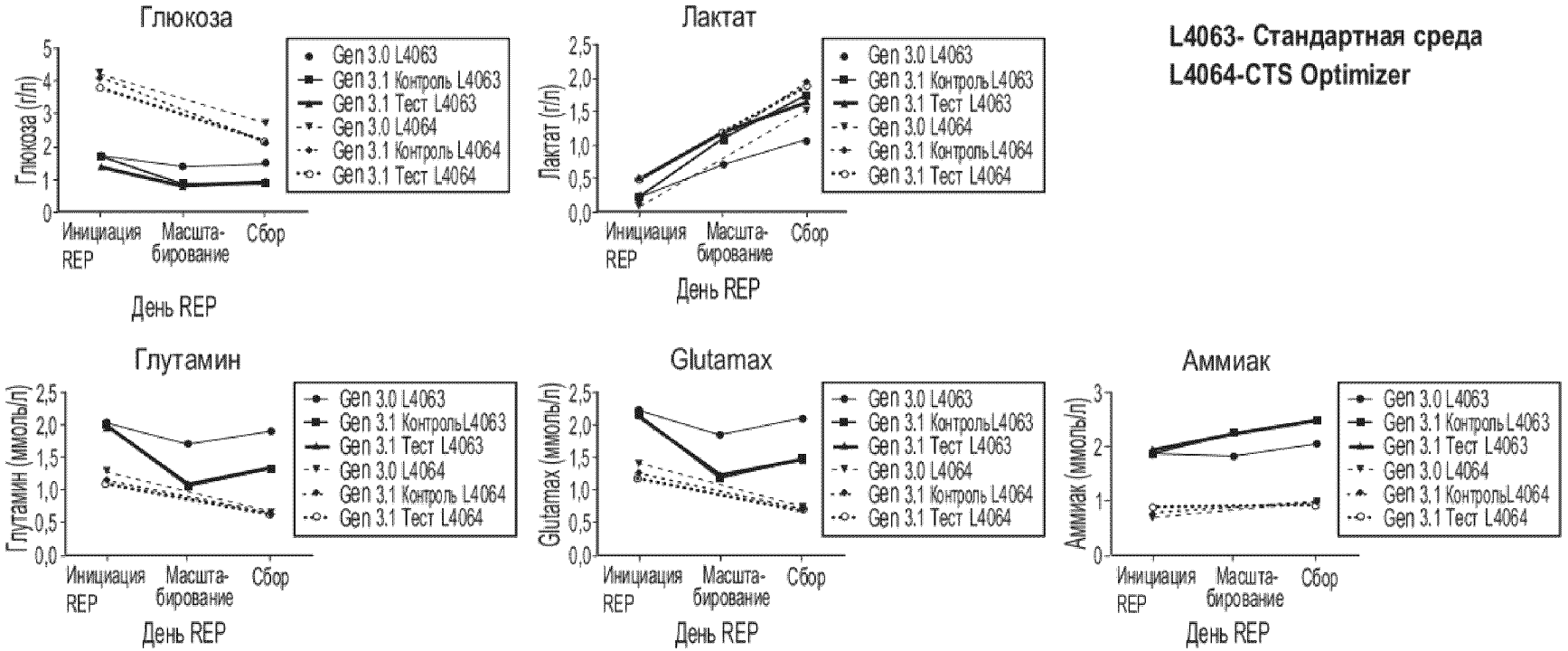
L4063 - Стандартная среда Gen 2:



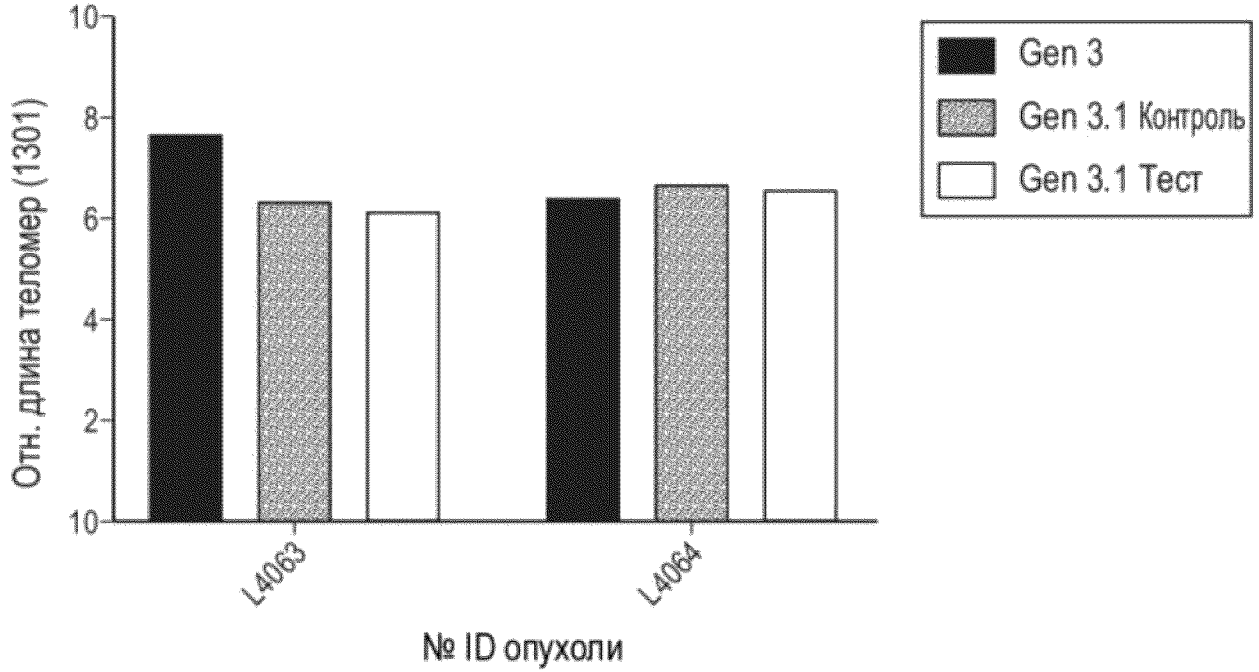
L4064- Среда CTS Optimizer

*ИФА ELISA с разбавителем AIM V

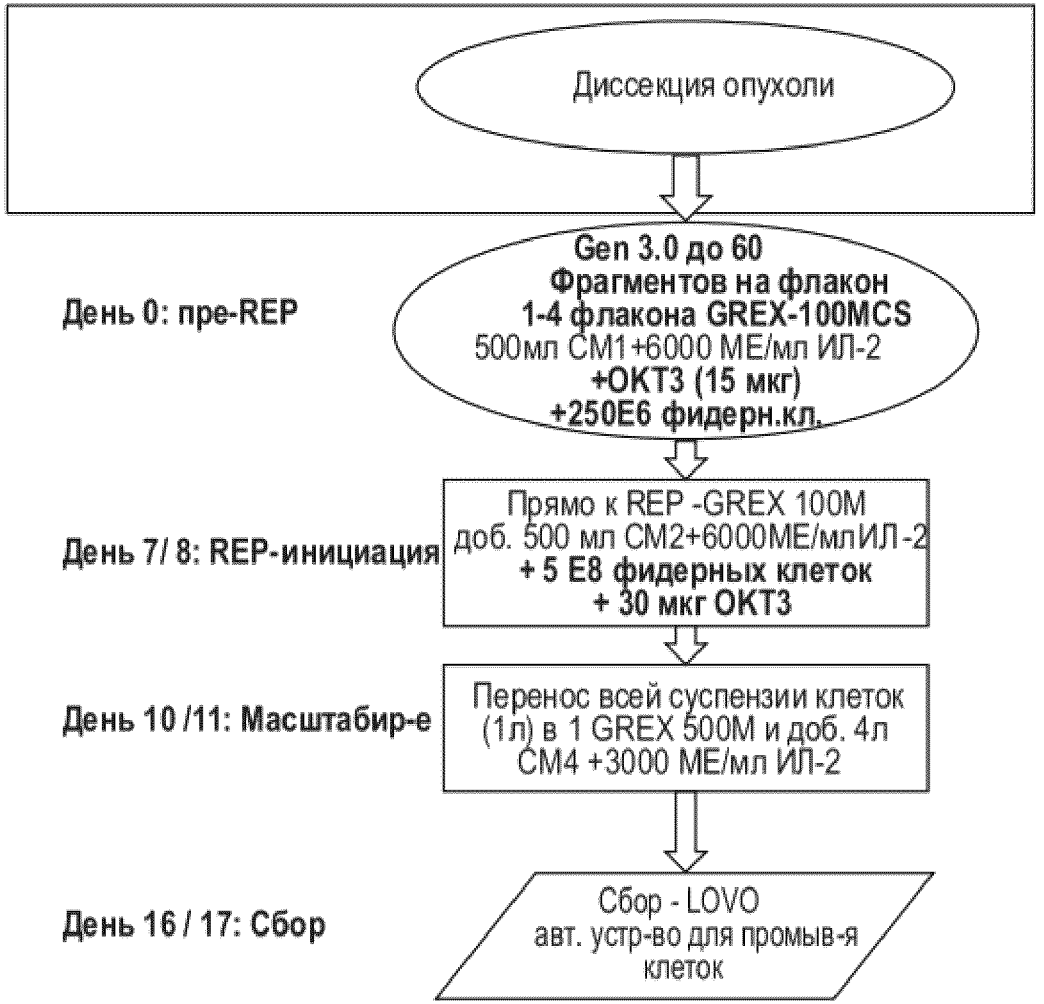
Фиг. 52


Глюкоза
Глюкоза (г/л)
Gen 3.0 L4063
Gen 3.1 Контроль L4063
Gen 3.1 Тест L4063
Gen 3.0 L4064
Gen 3.1 Контроль L4064
Gen 3.1 Тест L4064
Инициация REP
Масшта-бирование
Сбор
День REP
Лактат
Лактат (г/л)
L4063- Стандартная среда
L4064-CTS Optimizer
Глутамин
Глутамин (ммоль/л)
Glutamax
Glutamax (ммоль/л)
Аммиак
Аммиак (ммоль/л)

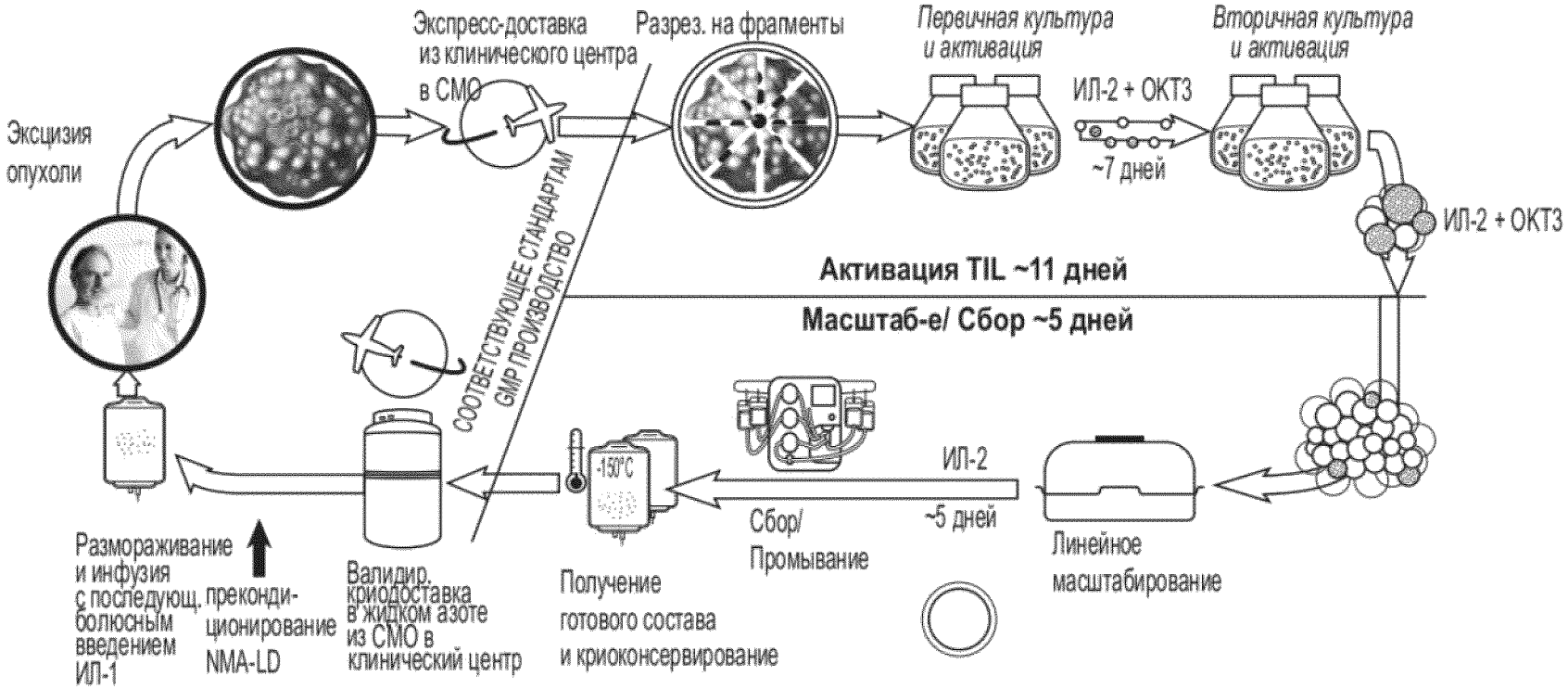
Фиг. 53


10
8
6
4
2
10
Отн. длина теломер (1301)
Gen 3
Gen 3.1 Контроль
Gen 3.1 Тест
L4063
L4064
№ ID опухоли

Фиг. 54


Диссекция опухоли
День 0: пре-REP
Gen 3.0 до 60
Фрагментов на флакон
1-4 флакона GREX-100MCS
500мл СМ1+6000 МЕ/мл ИЛ-2
+OKT3 (15 мкг)
+250E6 фидерн.кл.
День 7/ 8: REP-инициация
Прямо к REP -GREX 100M
доб. 500 мл СМ2+6000МЕ/млИЛ-2
+ 5 E8 фидерных клеток
+ 30 мкг OKT3
День 10 /11: Масштабир-е
Перенос всей суспензии клеток
(1л) в 1 GREX 500M и доб. 4л
СМ4 +3000 МЕ/мл ИЛ-2
День 16 / 17: Сбор
Сбор - LOVO
авт. устр-во для промыв-я
клеток

Фиг. 55


Экспресс-доставка
из клинического центра
в СМО
Разрез. на фрагменты
Первичная культура
и активация
Вторичная культура
и активация
ИЛ-2 + OKT3
~7 дней
ИЛ-2 + OKT3
Эксцизия
опухоли
Активация TIL ~11 дней
Масштаб-е/ Сбор ~5 дней
СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ СТАНДАРТАМ
GMP ПРОИЗВОДСТВО
-150°C
ИЛ-2
~5 дней
Сбор/
Промывание
Линейное
масштабирование
Размораживание
и инфузия
с последующ.
болюсным
введением
ИЛ-1
преконди-
ционирование
NMA-LD
Валидир.
криодоставка
в жидком азоте
из СМО в
клинический центр
Получение
готового состава
и криоконсервирование

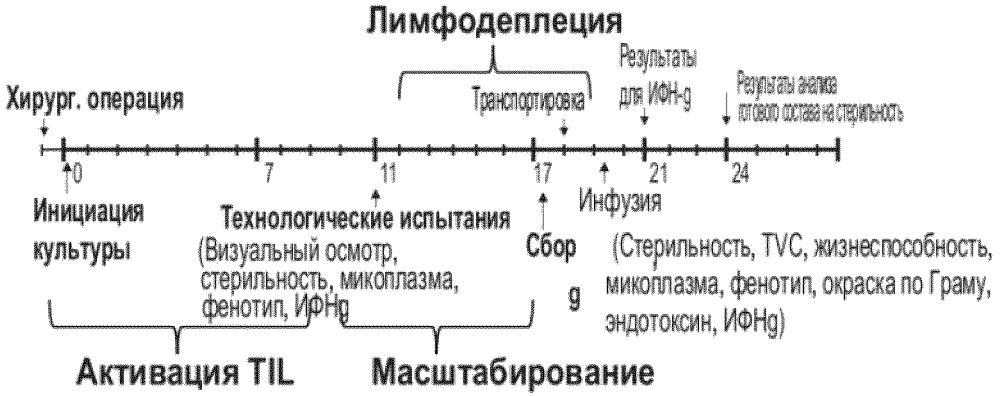
Фиг. 56

	Gen 2	Gen 3
Общая продолжительность культивирования	22 дня	16-17дней
Пре-REP		
Кол-во фрагментов /флакон	≤60 фрагментов в 1 флаконе	≤60 фрагментов /флакон (до 4 флаконов)
Объем среды	1л - однократное добавление	1л – 2 х 500мл добавл.
Целевые пре-REP кол-ва клеток	≤200e6 TIL	Непрерывное культивирование для всех клеток
Скрининг	Без скрининга	Без скрининга
Отбор флаконов	Без отбора	Тест на стерильность Bac-T, визуальный осмотр на наличие загрязнителей
REP / Масштабирование		
Фидеры		Кол-во снижено на ≥ 40%
Среда	Содержит ЧСА В	С заданным составом
Масштабирование	Объединенная культура Сниж-е объема до 500мл на 5 день, разделение, до 5 флаконов (2500 см2)	Линеиное масштабирование во флаконах рассматр. как субкомпоненты
ОКТ3	150 мкг	Максимум ≤180 мкг
ИЛ-2	Высокодозный	Высокодозный
Количество флаконов	1-5	1-4
Сбор - Уменьшение объема	Вкл. 10:1	Вкл. 10:1
Концентрация/Промывание	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
Получение готового состава	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
Транспортировка	Пары жидкого азота	Пары жидкого азота
Инфузия	Разморож., в/в, самотеком	Разморож., в/в, самотеком

Фиг. 57A

	Gen 2	Gen 3
Общая продолжительность культивирования	22 дня	16
Кол-во фрагментов /флакон	≤60 фрагментов в 1 флаконе	≤60 фрагментов /флакон (до 4 флаконов)
Объем среды	1л - однократное добавление	1л – 2 х 500мл добавл.
Целевые пре-REP кол-ва клеток	≤200e6 TIL	Непрерывное культивирование для всех клеток
Скрининг	Без скрининга	Без скрининга
Отбор флаконов	Без отбора	Тест на стерильность Bac- T, визуальный осмотр на наличие загрязнителей
REP / Масштабирование		
Фидеры		Кол-во снижено на ≥ 40%
Среда	Содержит ЧСА B	С заданным составом
Масштабирование	Объединенная культура Сниж-е объема до 500мл на 5 день, разделение, до 5 флаконов (2500 см2)	Линейное масштабирование во флаконах рассматр. как субкомпоненты
ОКТ3	150 мкг	Максимум ≤180 мкг
ИЛ-2	Высокодозный	Высокодозный
Количество флаконов	1-5	1-4
Сбор - Уменьшение объема	Закр.10:1	Вкл. 10:1
Концентрация/Промывание	LOVO 100:1	LOVO 1000:1
Получение готового продукта	1:1 CS10 (5% DMSO)	1:1 CS10 (5% DMSO)
Транспортировка	Пары жидкого азота	Пары жидкого азота
Инфузия	Разморож, в/в, самотеком	Разморож., в/в, самотеком

Фиг. 57B



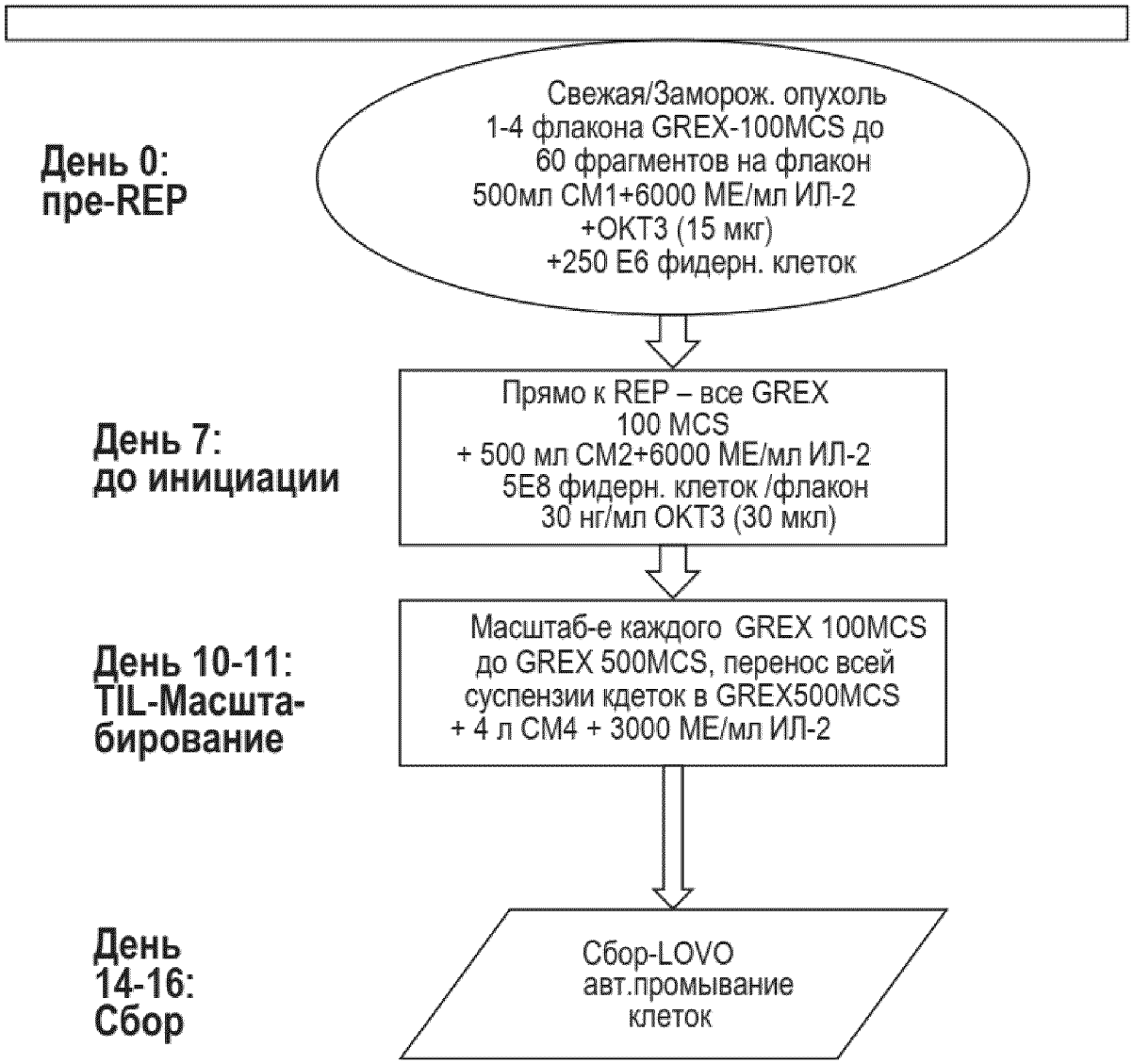
ЛД:
День10-11 Жизнеспособность
Дни 10-11 Фенотип
День10-11 микоплазма
День 10-11 ИФНg*

Выпуск для инфузии:
Окраска по Граму
День 10-11 Стерильность
День 16-17 микоплазма
День16-17 эндотоксин
День16-17 фенотипирование
День16-17 TVC
День16-17 Жизнеспособность

Выпускающий контроль качества (CoA)
День 16-17 Заморож:Разморож ИФНg (ELISA)
День 16-17 эндотоксин
День16-17 фенотипирование
День 16-17 TVC
День 16-17 Жизнеспособность
День16-17 Стерильность

*** Рестимуляция для ИФА ELISA на 10-11 день из свежего / замороженного в процессе производства образца; отчет на 14 день**

Фиг. 58


День 0:
пре-REP
Свежая/Заморож. опухоль
1-4 флакона GREX-100MCS до
60 фрагментов на флакон
500мл СМ1+6000 МЕ/мл ИЛ-2
+OKT3 (15 мкг)
+250 Е6 фидерн. клеток
День 7:
до инициации
Прямо к REP – все GREX
100 MCS
+ 500 мл СМ2+6000 МЕ/мл ИЛ-2
5Е8 фидерн. клеток /флакон
30 нг/мл OKT3 (30 мкл)
День 10-11:
TIL-Масшта-
бирование
Масштаб-е каждого GREX 100MCS
до GREX 500MCS, перенос всей
суспензии кдеток в GREX500MCS
+ 4 л СМ4 + 3000 МЕ/мл ИЛ-2
День
14-16:
Сбор
Сбор-LOVO
авт.промывание
клеток

Фиг. 59

Обобщенные данные 16/17 дня

Тестируемый параметр	1опытн. запуск, день17 10 марта 2019	2опытн. запуск, день 17 11 марта 2019	3 опытн. запуск, день17 25 марта 2019	Gen 2 (n=47)		
				Средн	Медиана	ст.откл.
Пре-LOVO TVC	17,3E+09	46,1E+09				
Пре-LOVO % Жизнесп.	90,5%	94,3%				
Пост-LOVO TVC	17,9E+09	59,4E+09	48,2E+09			
Пост-LOVO %Жизнесп.	85,3%	90,7%	89%			
TVC пост-LOVO % Восст.	103,5%	128,9%				
%CD45+/CD3+	88,0%	98,3%				
ИФНγ (пг/мл)	11,618	19,235		10005	9637	5128
GrzB (пг/мл)	11,326	27,441		19929	16040	
Стерильность	Неопр. (*)	Неопр. (*)				
Эндотоксин (EU)	154,2 EU	195,9 EU				
Микоплазма	Отриц.	Отриц.				
Окраска по Граму	Не детектировано	Не детектировано				

Фиг. 60

* *Составляет в сумме образец TIL (100% живых клеток, CD14-, за исключением моноцитов)*

Характеристика	Опытный запуск #1	Опытный запуск #2
NK-клетки (CD3-CD56+) (%)	10,9	1,5
B-клетки (CD3-CD19+) (%)	0,2	0,2
Моноциты (CD14+) (%)	0,0	0,0
TCRαβ (%)	87,1	96,3
TCRγδ (%)	1,2	1,6
Всего	99,4	99,6

**Составляет в сумме 100% TCRab*

Характеристика	Опытный запуск #1	Опытный запуск #2
Необуч.: CCR7+CD45RA+ (%)	0,0	0,1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	92,2	84,4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	7,7	15,5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0,1	0,1
Всего	100,0	100,0

**Составляет в сумме 100% живых клеток, CD14-*

Характеристика	Опытный запуск #1	Опытный запуск #2
$TCR\alpha\beta^+$ $CD4^+$ (%)	89,6	71,8
$TCR\alpha\beta^+$ $CD8^+$ (%)	10,0	27,8
Всего	99,6	99,6

Фиг. 61

* *Составляет в сумме образец TIL (100% живых клеток, CD14-, за исключением моноцитов)*

Характеристика	Пилотный запуск #1 L4063	Пилотный запуск #2 L4064
NK-клетки (CD3-CD56+) (%)	1,04	0,52
B-клетки (CD3-CD19+) (%)	0,0076	0,013
Моноциты (CD14+) (%)	0,032	0,043
TCRαβ (%)	95,5	96,7
TCRγδ (%)	2	1,86
Всего	98,6	99,14

**Составляет в сумме 100% TCRab*

Характеристика	Пилотный запуск #1 L4063	Пилотный запуск 2 L4064
Необуч.: CCR7+CD45RA+ (%)	0,35	0,07
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	97,4	96,7
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1,39	2,78
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0,88	0,44
Всего	100,0	100,0

Характеристика	Пилотный запуск #1 L4063	Пилотный запуск #2 L4064
$TCR\alpha\beta^+ CD4^+$ (%)	77,5	57,4
$TCR\alpha\beta^+ CD8^+$ (%)	16,8	36,1
Всего	94,3	93,5

Фиг. 62

Характеристика	OV-8025			OV-8026			OV-8028			OV-8022		
	FRER*	Gen 2Y	Gen 3.1	FRERY	Gen 2	Gen 3.1	FRER	Gen 2Y	Gen 3.1	FRER	Gen 2Y	Gen 3.1*
Чистота												
Т-клетки ($CD45^+CD3^+$) (%)	-	-	99,2	-	75,1	97,5	97	-	97,6	53,6	16,4	-
NK-клетки ($CD3^-CD56^+$) (%)	-	-	0,2	-	8,4	1,1	0,4	-	0,1	44,6	81,1	-
B-клетки (CD3-CD19+) (%)	-	-	0	-	2,1	0	0	-	0	1,3	3.3	-
Моноциты (CD14+) (%)	-	-	0	-	0,2	0	0	-	0	2	0,1	-
Идентичность Т-клеток												
TCR αβ (%)	-	-	98,8	-	71,9	96,4	98,7	-	99,4	52,2	12,4	-
TCR γδ (%)	-	-	0,3	-	0,8	0,6	0	-	0,1	0,1	0	-
$CD3^+CD4^+$ (%)	-	-	85,7	-	63,1	81,5	81,8	-	92,3	77,3	48,6	-
$CD3^+CD8^+$ (%)	-	-	12	-	23	14,4	15,5	-	5,2	16,6	26,1	-
Фенотип клеток памяти-TCRαβ+												
Необученные: CCR7+CD45RA+ (%)	-	-	0	-	0,4	0	2,1	-	0	0	0,1	-
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	-	-	98,5	-	88,7	97,5	93,6	-	97,1	89,1	93,8	-
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	-	-	1	-	7,5	0,6	1,9	-	2,5	0,1	0	-
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	-	-	0,4	-	3,4	1,8	2,4	-	0,3	10,8	6,1	-

FR ER, заморож. опухоль, REP на ранней стадии
*, Условия не тестировали
Y, Проблема при взятии образца, низкий TVC/нежизнесп. клетки при размораживании

Фиг. 63

Характеристика	Иерархия	Опытн. запуск #1	Опытн. запуск #2
NK-клетки (CD3-CD56+) (%)	S1/S2/Все/Жив/CD14-/CD3-/NK |	10,9	1,5
B-клетки (CD3-CD19+) (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/CD19 | частота нулевых (%)	0,2	0,2
Моноциты (CD14+) (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14+ | частота исх.(%)	0,0	0,0
TCRαβ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab | частота нулевых (%)	87,1	96,3
TCRγδ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRgd | частота нулевых (%)	1,2	1,6
TCRαβ+CD4+ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/CD4 | частота исх.(%)	89,6	71,8
TCRαβ+CD8+ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/CD8 | частота исх. (%)	10,0	27,8
Необуч.: CCR7+CD45RA+ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q2: CCR7+, CD45RA+ | частота исх.(%)	0,0	0,1
T-EM: CCR7-CD45RA-(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q4: CCR7-, CD45RA- | частота исх.(%)	92,2	84,4
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q3: CCR7+, CD45RA- | частота исх.(%)	7,7	15,5
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q1: CCR7-, CD45RA+ | частота исх.(%)	0,1	0,1
Необуч.: CD62L+CD45RA+ (%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q6: CD62L+, CD45RA+ | частота исх. (%)	0,2	0,1
T-EM: CD62L-CD45RA-(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q8: CD62L-, CD45RA- | частота исх. (%)	47,7	49,5
T-CM: CD62L+CD45RA-(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q7: CD62L+, CD45RA- | частота исх. (%)	52,1	50,4
T-EFF/TEMRA: CD62L-CD45RA+(%)	S1/S2/Все/Ж/CD14-/TCRab/Q5: CD62L-, CD45RA+ | частота исх. (%)	0,1	0,0

**Составляет в сумме D3+CD45+ %*

Характеристика	Опытн. запуск #1	Опытн. запуск #2
TCRαβ (%)	87,1	96,3
TCRγδ (%)	1,2	1,6
Всего	88,3	97,9

Фиг. 64

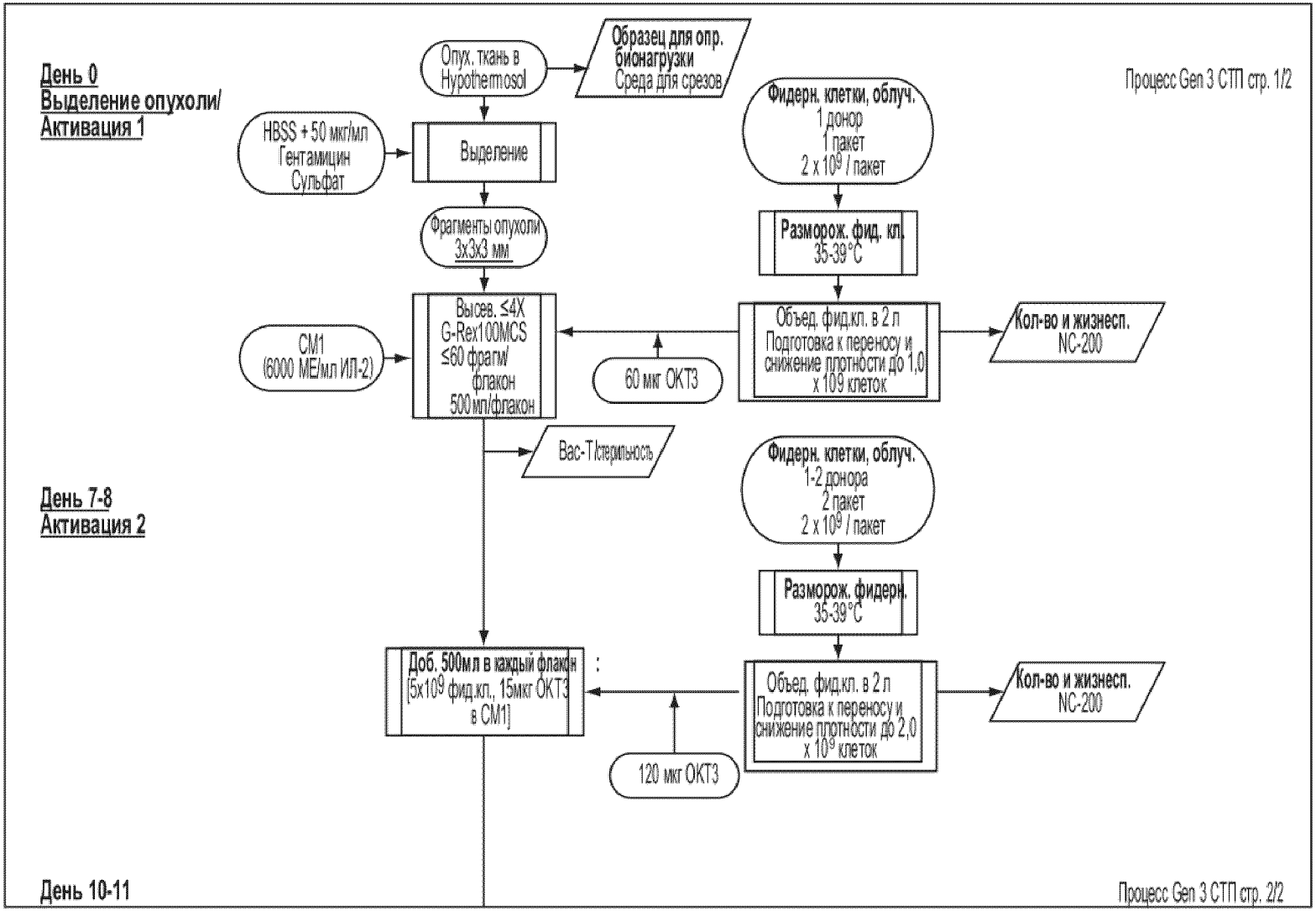
Характеристика	Иерархия	CD4+		CD8+	
		Опытн. запуск #1	Опытн. запуск #2	Опытн. запуск #1	Опытн. запуск #2
CD27+ (%)	S1/S2/Bcell/Ж/CD14-/TCRab/CD4 или CD8/CD4+/8+CD27+ | частота исх.(%)	0,7	2,0	2,1	12,7
CD28+ (%)	S1/S2/Bcell/Ж/CD14-/TCRab/CD4 или CD8/CD4+/8+CD28+ | частота исх.(%)	41,2	50,1	3,6	13,9
CD57+ (%)	S1/S2/Bcell/Ж/CD14-/TCRab/CD4+/8+CD57+ | частота исх.(%)	1,0	6,9	0,1	3,7
2B4+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 или CD8/b1a | частота исх.(%)	4,5	5,5	69,1	55,7
BTLA4+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4или CD8/2b4 | частота исх.(%)	67,5	86,1	79,6	89,1
CCR4+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4или CD8/CCR4+ | частота исх. (%)	94,1	93,6	84,2	96,6
CD25+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 или CD8/CD25 | частота исх.(%)	63,1	61,0	47,5	51,8
CD69+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/CD69 | частота исх.(%)	47,0	22,8	45,4	25,8
CD95+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/CD95 | частота исх..(%)	99,2	98,1	99,1	97,6
CD103+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/CD103 | частота исх. (%)	4,2	10,7	25,0	36,9
CXCR3+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 /CD8/CXCR3 | частота исх. (%)	58,1	76,7	89,3	88,3
KLRG1+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/KLRG1 | частота исх. (%)	0,3	8,9	3,1	35,8
LAG3+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/Lag3 | частота исх.(%)	5,0	3,3	19,4	21,2
PD1+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/PD1 | частота исх. (%)	29,3	22,1	11,2	7,2
TIGIT+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/Tigit | частота исх.(%)	68,1	53,2	74,9	65,8
TIM3+ (%)	S/S/Жив/CD3/CD4 / CD8/TIM3 | частота исх. (%)	93,6	81,8	91,2	84,4

Фиг. 65

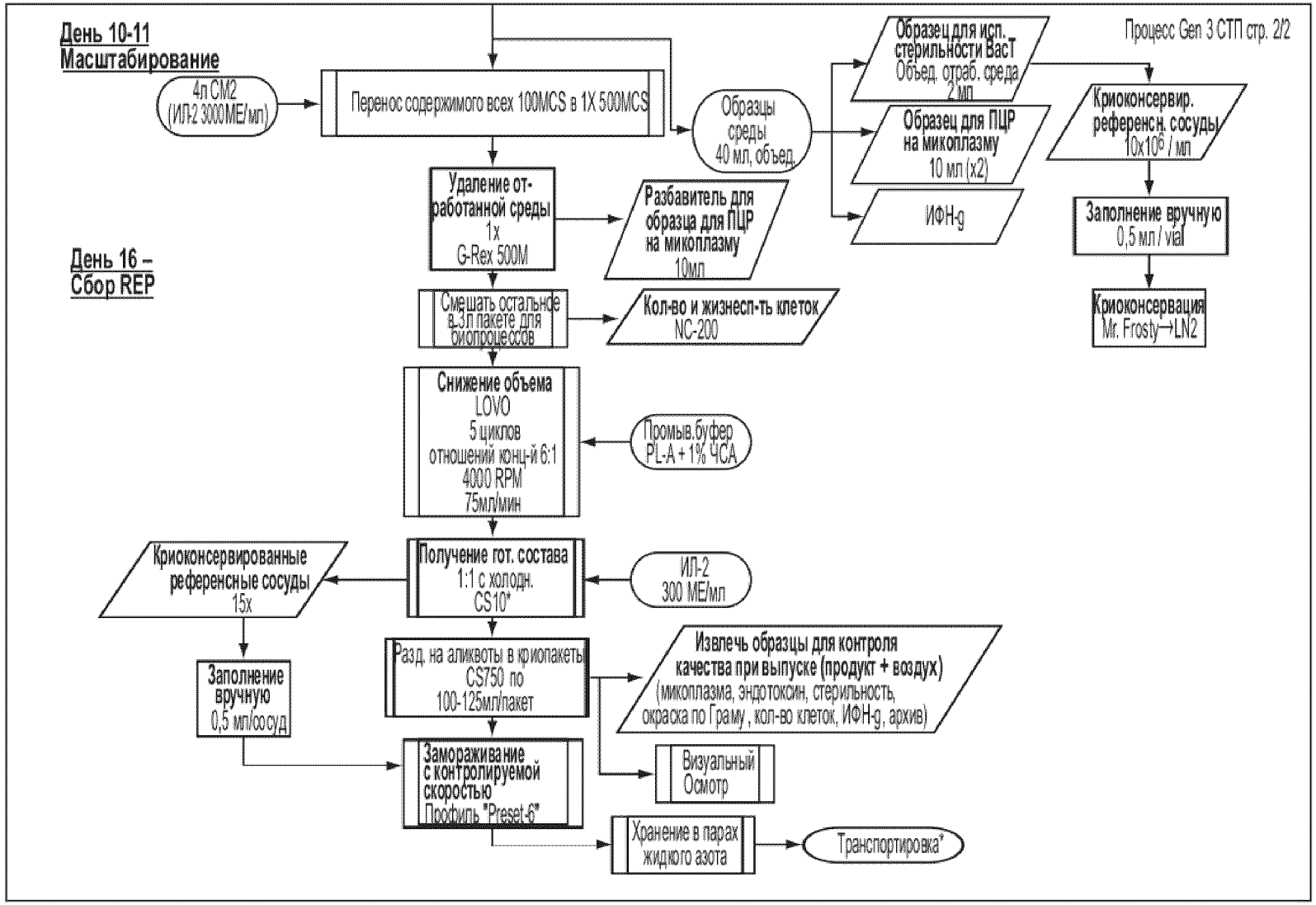
	1:100 стим/1:50 нестим			1:200 стим/1:100нестим			1:400 стим/1:200нестим					
Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Средн	Стим.-Нестим.	Кратность индукции
Опытн 1 Стимулир	13001,49	16033,00	14083,24	11008,85	15254,59	12534,24	9985,83	14237,22	11669,82	13089,81	11325,97	7,42
Опытн 1 Нестимулир	2155,31	2445,64	2108,37	1727,43	1982,96	1566,52	1119,057	1611,132	1158,179	1763,84		
Опытн 1 Стимулир Контр	26491,92	31766,20	31601,13	26385,05	30852,42	29752,34	26175,43	33462,43	29728,52	29579,49	13486,52	1,84
Опытн 1 Нестимулир Контр	16209,90	16478,69	16936,51	15659,69	16385,60	17083,36	15419,07	15683,49	14980,40	16092.97		

	1:100 стим/1:50 нестим			1:200 стим/1:100 нестим			1:400 стим/1:200нестим					
Образец	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Средн	Стим.-Нестим.	Кратность индукции
Опытн 2 Стимулир	31509,54	30435,33	33822,81	27299,28	29091,87	29432,13	29027,45	30685,94	31138,70	30271,45	27441,29	10,70
Опытн 2 Нестимулир	3236,50	3442,58	3630,97	2764,12	2839,66	2892,96	2047,795	2291,994	2324,838	2830,16		
Опытн 2 Стимулир Контр	21515,93	20346,31	19425,54	18299,25	17398,91	18131,38	18825,27	18412,15	18278,94	18959,30	6189,32	1,48
Опытн 2 Нестимулир Контр	13716,23	13445,80	13563,89	12782,28	12678,37	13122,65	11898,75	11675,48	12046,29	12769,97		

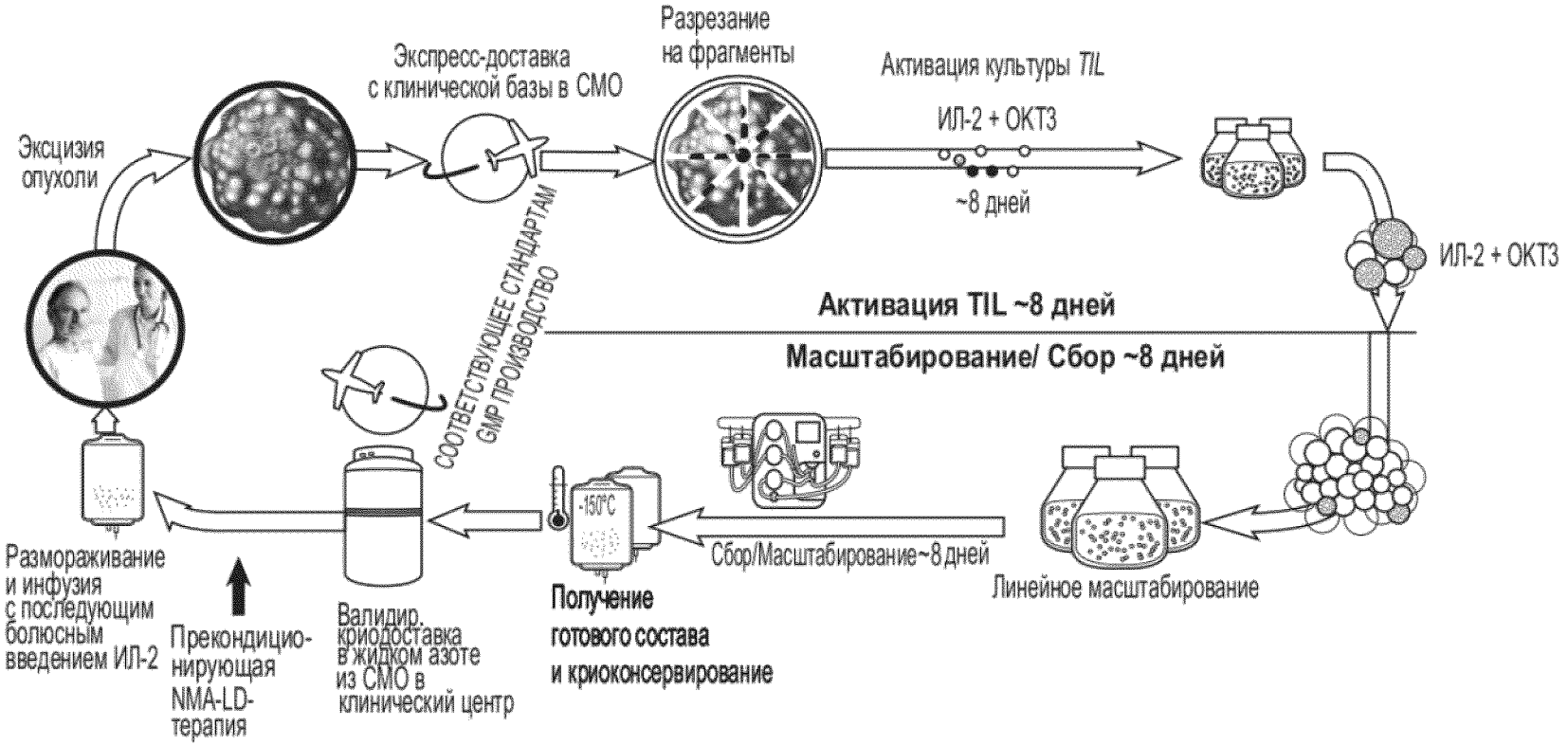
Фиг. 66


День 0
Выделение опухоли/
Активация 1
Опух. ткань в Hypothermosol
Образец для опр. бионагрузки
Среда для срезов
Процесс Gen 3 СТП стр. 1/2
HBSS + 50 мкг/мл Гентамицин Сульфат
Выделение
Фидерн. клетки, облуч.
1 донор
1 пакет
2 x 10^9 / пакет
Фрагменты опухоли 3x3x3 мм
Разморож. фид. кл. 35-39°C
Высев. ≤4X G-Rex100MCS ≤60 фрагм/ флакон 500 мл/флакон
СМ1 (6000 МЕ/мл ИЛ-2)
60 мкг ОКТ3
Объед. фид.кл. в 2 л Подготовка к переносу и снижение плотности до 1,0 x 10^9 клеток
Кол-во и жизнесп. NC-200
Вас-Т Стерильность
День 7-8
Активация 2
Фидерн. клетки, облуч.
1-2 донора
2 пакет
2 x 10^9 / пакет
Разморож. фидерн. 35-39°C
Доб. 500мл в каждый флакон [5x10^9 фид.кл., 15мкг ОКТ3 в СМ1]
Объед. фид.кл. в 2 л Подготовка к переносу и снижение плотности до 2,0 x 10^9 клеток
Кол-во и жизнесп. NC-200
120 мкг ОКТ3
День 10-11
Процесс Gen 3 СТП стр. 2/2

Фиг. 67A


День 10-11
Масштабирование
Процесс Gen 3 СТП стр. 2/2
4л СМ2
(ИЛ-2 3000МЕ/мл)
Перенос содержимого всех 100MCS в 1X 500MCS
Образцы среды 40 мл, объед.
Образец для исп. стерильности BacT Объед. отраб. среда 2 мл
Образец для ПЦР на микоплазму 10 мл (x2)
ИФН-g
Криоконсервир. референсн. сосуды 10x10^6 / мл
Заполнение вручную 0,5 мл / vial
Криоконсервация Mr. Frosty→LN2
Удаление отработанной среды 1x G-Rex 500M
Разбавитель для образца для ПЦР на микоплазму 10мл
День 16 – Сбор REP
Смешать остальное в 3л пакете для биопроцессов
Кол-во и жизнесп-ть клеток NC-200
Снижение объема LOVO 5 циклов отношений конц-й 6:1 4000 RPM 75мл/мин
Промыв.буфер PL-A + 1% ЧСА
Криоконсервированные референсные сосуды 15x
Получение гот. состава 1:1 с холодн. CS10*
ИЛ-2 300 МЕ/мл
Заполнение вручную 0,5 мл/сосуд
Разд. на аликвоты в криопакеты CS750 по 100-125мл/пакет
Извлечь образцы для контроля качества при выпуске (продукт + воздух) (микоплазма, эндотоксин, стерильность, окраска по Граму, кол-во клеток, ИФН-g, архив)
Визуальный Осмотр
Замораживание с контролируемой скоростью Профиль "Preset-6"
Хранение в парах жидкого азота
Транспортировка*

Фиг. 67B


Разрезание
на фрагменты
Экспресс-доставка
с клинической базы в CMO
Активация культуры TIL
ИЛ-2 + OKT3
Эксцизия
опухоли
~8 дней
ИЛ-2 + OKT3
Активация TIL ~8 дней
Масштабирование/ Сбор ~8 дней
СООТВЕТСТВУЮЩЕЕ СТАНДАРТАМ
GMP ПРОИЗВОДСТВО
-150°C
Сбор/Масштабирование~8 дней
Линейное масштабирование
Получение
готового состава
и криоконсервирование
Валидир.
криодоставка
в жидком азоте
из CMO в
клинический центр
Прекондицио-
нирующая
NMA-LD-
терапия
Размораживание
и инфузия
с последующим
болюсным
введением ИЛ-2

Фиг. 68

ЭТАП	Gen 2	Gen 2.1	Gen 3.0
Пре-REP-день 0	≤ 50 фрагментов/ 1 G-Rex 100MCS - **11 дней**	≤ 180 фрагментов/ 3 G-Rex, Заранее приготовленная нагретая среда CM1 100MCS - **11 дней**	***Свежая или замороженная опухоль*** Целая опухоль, ≤ 30 фрагментов до 60 фрагментов на 1 G-Rex. 100MCS (до 4 G-Rex), Заранее приготовленная нагретая среда, **7 дней. Пре-REP 250e6 фидерных клеток + OKT-3 (15 мкг)**
Инициация REP	Прямо к REP- 11 день - **<200e^6 TIL** 1 G-Rex 500MCS	Прямо к REP- 11 день - **<200 e^6 TIL** Заранее приготовленная нагретая среда CM2 в G-Rex 500MCS	Прямо к REP- День**7- все клетки TIL - те же G-Rex 100MCS (100MCS, до 4 GREX), Стандартная среда или среда с зад. составом (б/сывороточная). Доп. 500e6 фидерных клеток +OKT-3 (30мкг)**
Размножение или масштабирование TIL	1 - 5 G-REX 500MCS **Разделение - 16 день**	2 - 5 G-REX 500MCS Заранее приготовленная нагретая среда CM4 **Разделение - 16 день**	Перенос суспензии TIL G-REX 100MCS в G-REX 500MCS, до 4 GREX 500 MCS- стандартная среда или среда с зад. составом (б/сывороточная) **Масштабирование на 10 или 11 день**
Сбор	**Сбор - 22 день,** LOVO-авт. промыв-е клеток	**Сбор - 22 день,** LOVO-авт. промыв-е клеток (5 цикла промыв-я)	**День сбора 14 или 16** LOVO-авт. промыв-е клеток (5 цикла промыв-я)
Итоговый состав	Криоконсервир. продукт 300МЕ/мл ИЛ2- CS10 в LN_2 несколько аликвот	Криоконсервир. продукт 300МЕ/мл ИЛ2- CS10 в LN_2 несколько аликвот	Криоконсервированный продукт 300МЕ/мл ИЛ2- CS10 в LN_2 несколько аликвот
Продолжительность процесса	**22 дня**	**22 дня**	**16 дней**

Фиг. 69

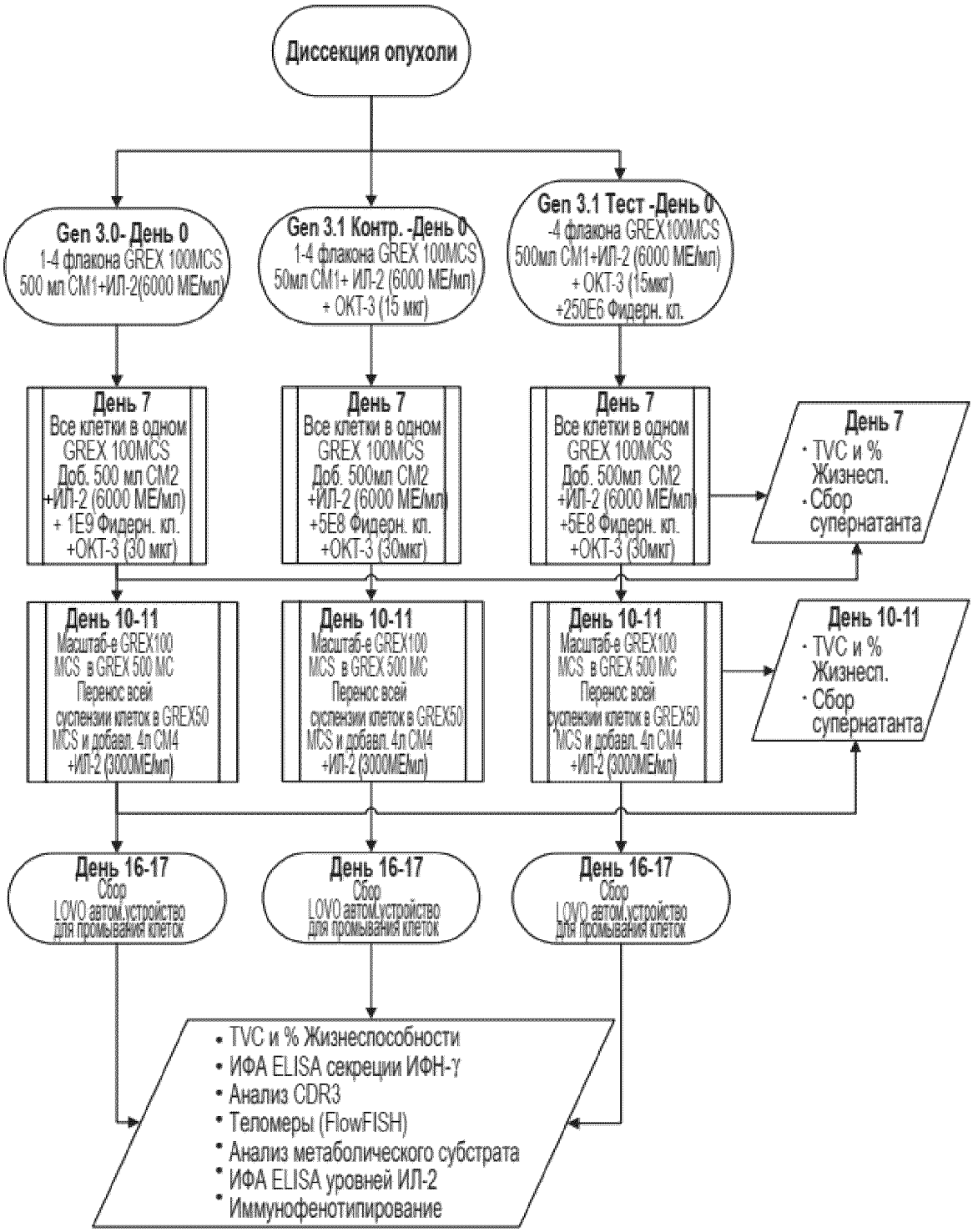
Сравнение Процессов	Изменения в процессе	Различия
Gen 2 : Gen 2.1	• Процесс начинают с 2 флаконов, а не с одного • Разделяют фидерный слой при инициации REP между 2 флаконами G-Rex500MCS • Заранее готовят среду и нагревают перед использованием	• Потенциальное удвоение итогового кол-ва клеток (дозы) при увелич. репертуаре TIL • Резервирование на протяжении всего процесса
Gen 2.1 : Gen 3.1	• Свежая или заморож. опухоль • 14-16-дневный процесс (вместо 22 дней) • Меньше общий фидерный слой на протяжении процесса • Фидерный слой и OKT3 на 0 день • REP начинают с фрагментами • Масштаб-е 100MCS до 500MCS • Масштаб-е в несколько пре-REP флаконов • Стандартная среда и среда с заданным составом (бессывороточная)	• Повышенная активность • Улучшенный фенотип • Меньшая продолжительность процесса • Меньшее тестирование реагентов • Сниженная изменчивость процесса • Реагенты с заданным составом • Больший репертуар • Меньше загрязняющих примесей (фидерный слой) • Сравнимая или более высокая доза.

Фиг. 70

День процесса	Условия	Gen 3.0	Gen 3.1 контроль	Gen 3.1 Тест
День 0 : Выделение и активация фрагментов опухоли	Среда (*)	500 мл	500 мл	500 мл
	ИЛ-2	6000 МЕ/мл	6000 МЕ/мл	6000 МЕ/мл
	ОКТ-3	-	15 мкг	15 мкг
	Фидерные клетки	-	-	2,5E+06
День процесса	**Условия**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 контроль**	**Gen 3.1 Тест**
День 7 - 8 : Реактивация культуры TIL	Среда (*)	500 мл	500 мл	500 мл
	ИЛ-2	6000 МЕ/мл	6000 МЕ/мл	6000 МЕ/мл
	ОКТ-3	30 мкг	30 мкг	30 мкг
	Фидерные клетки	1 E+09	500 E+06	500E+06
	Общее кол-во фидерн. клеток, добавленных за 7 день	1 E+09	500 E+06	750E+06
День процесса	**Условия**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 контроль**	**Gen 3.1 Тест**
День 10-11 : Масштабирование культуры	Перенос из GREX 100 всей суспензии TIL в 1 GREX 500, содержащий 4л среды с ИЛ-2 (3000МЕ/мл)			
День процесса	**Условия**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 контроль**	**Gen 3.1 Тест**
День 16-17: Сбор/Промывание/ Готовый состав	Автомат. промывание клеток LOVO и криоконсервация с CS10.			

(*) Среда может представлять собой стандартную среду или бессывороточную среду CTS.

Фиг. 71


Диссекция опухоли
Gen 3.0- День 0
1-4 флакона GREX 100MCS
500 мл СМ1+ИЛ-2(6000 МЕ/мл)
Gen 3.1 Контр. -День 0
1-4 флакона GREX 100MCS
50мл СМ1+ ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+ ОКТ-3 (15 мкг)
Gen 3.1 Тест -День 0
-4 флакона GREX100MCS
500мл СМ1+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+ ОКТ-3 (15мкг)
+250E6 Фидерн. кл.
День 7
Все клетки в одном
GREX 100MCS
Доб. 500 мл СМ2
+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+ 1E9 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30 мкг)
День 7
Все клетки в одном
GREX 100MCS
Доб. 500мл СМ2
+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+5E8 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30мкг)
День 7
Все клетки в одном
GREX 100MCS
Доб. 500мл СМ2
+ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
+5E8 Фидерн. кл.
+ОКТ-3 (30мкг)
День 7
· TVC и %
Жизнесп.
· Сбор
супернатанта
День 10-11
Масштаб-е GREX100
MCS в GREX 500 MC
Перенос всей
суспензии клеток в GREX50
MCS и добавл. 4л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10-11
Масштаб-е GREX100
MCS в GREX 500 MC
Перенос всей
суспензии клеток в GREX50
MCS и добавл. 4л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10-11
Масштаб-е GREX100
MCS в GREX 500 MC
Перенос всей
суспензии клеток в GREX50
MCS и добавл. 4л СМ4
+ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 10-11
· TVC и %
Жизнесп.
· Сбор
супернатанта
День 16-17
Сбор
LOVO автом.устройство
для промывания клеток
День 16-17
Сбор
LOVO автом.устройство
для промывания клеток
День 16-17
Сбор
LOVO автом.устройство
для промывания клеток
• TVC и % Жизнеспособности
• ИФА ELISA секреции ИФН-γ
• Анализ CDR3
• Теломеры (FlowFISH)
• Анализ метаболического субстрата
• ИФА ELISA уровней ИЛ-2
• Иммунофенотипирование

Фиг. 72

День процесса	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Количество фрагментов	**53**	**53**	**53**	**21**	**21**	**21**
Ср.кол-во TVC на фрагмент к моменту сбора	1,37E+08	3,19E+08	3,53E+08	5,90E+08	7,57E+08	9,29E+08
TVC, день 7 (*)	2,59E+07	6,43E+07	1,45E+08	7,35E+06	9,28E+07	1,39E+08
TVC, день 10/11 (*)	6,07E+08	1,66E+09	1,83E+09	7,48E+08	1,28E+09	1,72E+09
Сбор TVC, день 16/17	7,26E+09	1,69E+10	1,87E+10	1,24E+10	1,59E+10	1,95E+10
Кратность Размножения (день 10 или 11 / день 7)	**23,4**	**25,8**	**12,6**	**101,8**	**13,8**	**12,4**
Кратность Размножения (День сбора 16 / день 7)	**280,3**	**262,8**	**129,0**	**1687,1**	**171,3**	**140,3**

(*) Подсчет клеток для дней 7 и 10/11 осуществляли исключительно в информационных целях. Исходя из дизайна процесса, образцы отбирали непосредственно из каждого флакона после перемешивания его содержимого путем вращения, без уменьшения объема. Таким образом, анализ и выводы из данных о количестве клеток в указанных образцах ограничены природой методики взятия образцов.

Фиг. 73

День процесса	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	74,6%	92,1%	88,7%	88,0%	92,8%	95,0%
Масштабирование	92,1%	95,4%	94,0%	90,4%	94,3%	95,1%
Сбор	79,5%	89,4%	94,8%	88,8%	81,9%	84,9%

Фиг. 74

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
Маркеры	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
L/D Aqua	82,2	89,4	91,0	76,6	83,1	89,5
NK	1,3	0,4	1,0	2,5	0,2	0,5
TCRa/b+	88,6	97,5	95,5	93,0	97,3	96,7
CD4	56,4	85,8	77,5	33,8	64,8	57,4
CD4/CD27	3,8	2,1	3,4	6,7	0,7	2,2
CD4/CD28	82,7	71,8	80,2	97,5	73,5	66,8
CD4/CD56	0,4	0,5	0,7	0,5	0,5	0,3
CD4/CD57	6,7	17,0	20,5	16,0	7,6	8,0
CD8	29,6	11,2	16,8	51,9	28,9	36,1
CD8/CD27	15,0	25,6	30,5	14,1	3,3	6,7
CD8/CD28	47, 5	23,0	24,5	88,0	45,1	37,3
CD8/CD56	3,3	2,3	4,2	6,6	10,3	10,0
CD8/CD57	0,3	1,2	1,1	1,3	0,2	2,5

Фиг. 75

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
Маркеры	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
CD/CD4	56,4	85,8	77,5	33,8	64,8	57,4
TEMRA - CD4	0,4	0,7	0,4	1,1	0,7	0,2
Необуч. - CD4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,1	0,0
CM - CD4	45,6	16,8	29,3	46,3	30,6	29,9
EM - CD4	53,7	82,3	70,2	52,1	68,6	69,9
CD3/CD8	29,6	11,2	16,8	51,9	28,9	36,1
TEMRA - CD8	3,1	0,5	0,9	6,1	8,0	5,4
Необуч. - CD8	0,7	0,1	0,4	2,2	0,7	1,0
CM - CD8	22,0	15,8	29,7	61,9	18,9	18,2
EM - CD8	74,3	83,5	69,0	29,8	72,4	75,5

Фиг. 76

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
Маркеры	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
2B4+	2,1	0,6	1,0	2,0	1,2	1,3
BTLA4	99,7	95,4	96,9	99,5	98,8	98,1
CD25+	48,6	10,5	3,9	58,2	41,7	32,1
CD69+	27,1	37,7	21,5	39,4	35,6	30,5
CD95+	99,9	99,9	99,5	99,6	99,0	97,3
CD103+	0,7	1,2	0,4	1,4	1,3	1,2
KLRG1+	1,6	3,7	3,3	11,4	8,3	10,7
LAG3+	5,6	8,2	3,3	1,5	1,6	1,4
PD1+	77,4	58,4	41,6	34,1	28,4	26,7
TIGIT+	68,5	40,3	30,3	45,8	52,1	52,2
TIM3+	58,0	42,4	59,4	61,0	58,4	56,8

Фиг. 77

ID опухоли	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
Маркеры	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
2B4+	65,8	56,6	70,5	13,6	21,5	20,7
BTLA4	99,5	96,6	98,2	99,3	97,4	96,1
CD25+	41,4	10,5	5,9	60,6	32,0	17,1
CD69+	44,9	28,0	20,0	33,2	30,6	22,7
CD95+	99,6	99,6	98,9	98,9	96,1	93,5
CD103+	29,4	27,9	24,5	10,9	6,0	7,3
CXCR3+	99,9	99,9	99,8	99,3	99,2	99,2
KLRG1+	7,1	4,6	6,7	13,2	14,5	14,1
LAG3+	28,6	22,5	11,9	2,8	1,6	1,4
PD1+	56,9	54,5	51,7	25,4	20,0	23,6
TIGIT+	90,8	93,7	93,3	92,1	90,4	90,5
TIM3+	66,7	49,1	58,6	65,6	46,8	43,6

Фиг. 78

Характеризация TIL	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
ИФН-γ (пг/мл)	907	428	2863	1485	3130	3863

Результаты представлены как среднее для образцов в трех повторностях из одного репрезентативного эксперимента

Фиг. 79

	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 Контроль**	**Gen 3.1 Тест**	**Gen 3.0**	**Gen 3.1 Контроль**	**Gen 3.1 Тест**
Реактивация	12319,6	11928,7	11786,7	5891,6	5671,8	389,4(1)
Масштабирование	32095,1	30368,6	26145,0	*	*	*
Сбор	17309,3	13828,4	16019,2	656,0	826,2	768,9

Результаты представлены как среднее для трех повторностей образцов из одного репрезентативного эксперимента.

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

(1) Для тестового Gen 3.1 с L4064 в день реактивации данные содержат значительно более низкие значения, чем соответствующие значения для контрольного Gen 3.1 и условий Gen 3.0. Из-за небольшого количества взятого образца не было возможности повторить анализ для проверки точности указанного значения.

Фиг. 80

Глюкоза (г/л)						
	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	1,8	1,7	1,4	4,3	4,1	3,8
Масштабирование	1,4	0,9	0,8	*	*	*
Сбор	1,5	0,9	1,0	2,8	2,1	2,2

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

Фиг. 81

Лактат (г/л)						
	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	0,2	0,2	0,5	0,1	0,2	0,5
Масштабирование	0,7	1,1	1,2	*	*	*
Сбор	1,1	1,7	1,6	1,5	2,0	1,9

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

Фиг. 82

Глутамин (ммоль/л)						
	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	2,0	2,0	2,0	1,3	1,2	1,1
Масштабирование	1,7	1,1	1,1	*	*	*
Сбор	1,9	1,3	1,3	0,7	0,6	0,6

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

Фиг. 83

Glutamax (ммоль/л)						
	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	2,2	2,2	2,2	1,4	1,3	1,2
Масштабирование	1,9	1,2	1,2	*	*	*
Сбор	2,1	1,5	1,5	0,8	0,7	0,7

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

Фиг. 84

Аммиак (ммоль/л)						
	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
День процесса	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Реактивация	1,9	1,9	2,0	0,7	0,8	0,9
Масштабирование	1,8	2,2	2,3	*	*	*
Сбор	2,1	2,5	2,5	1,0	1,0	0,9

(*) Отработанные среды 10/11 дня для L4064 при запусках не собирали.

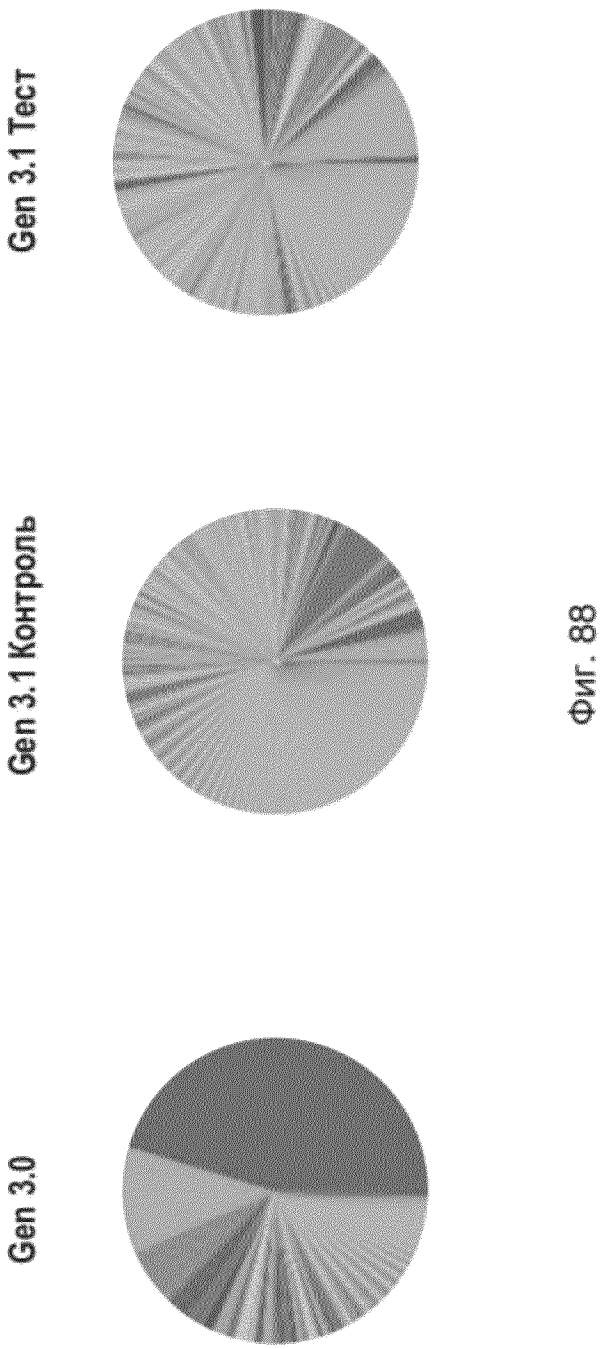
Фиг. 85

Характеризация TIL	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Относительная длина теломер	7,7	6,3	6,1	6,4	6,7	6,6

Фиг. 86

Характеризация TIL	L4063 в стандартной среде			L4064 в бессывороточной среде CTS		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
uCD3	14005,0	18149,0	17181,0	15107,0	21460,0	21503,0
Индекс энтропии Шеннона	5,9	10,8	10,5	85	10,7	10,4

Фиг. 87



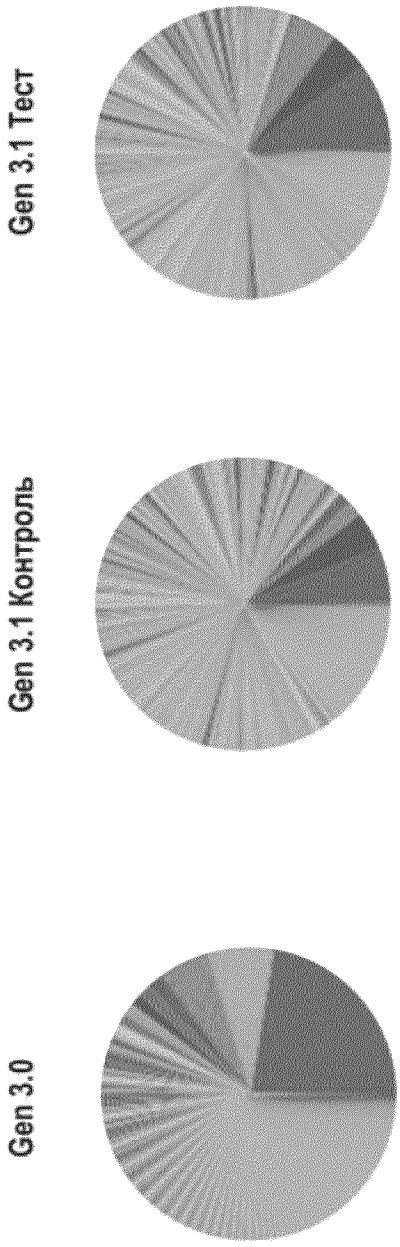
Фиг. 88

Количество uCDR3 (% перекр.) L4063	Все uCDR3			Лид. 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Gen 3.0	14005	3240 (23%)	2959 (21%)	1105	1000 (90%)	975 (88%)
Gen 3.1 Контроль	-	18149	-	-	2437	-
Gen 3.1 Тест	-	-	17181	-	-	2331

Фиг. 89

Количество uCDR3 (% перекр.) L4064	Все uCDR3			Лид. 80% uCDR3		
	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест	Gen 3.0	Gen 3.1 Контроль	Gen 3.1 Тест
Gen 3.0	15107	5486 (36%)	5541 (36%)	2478	2186 (88%)	2163 (87%)
Gen 3.1 Контроль	-	21460	-	-	3246	-
Gen 3.1 Тест	-	-	21503	-	-	3263

Фиг. 90



Фиг. 91

Этап	Оптимизированный процесс Gen 3
День 0 Выделение и активация опухоли	≤240 фрагментов ≤60 фрагментов/флакон ≤4 флаконов ≤2л среды (500мл/флакон) ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) $2,5x10^8$ фидерных клеток/флакон 15мкг OKT3/флакон
День 7 - 8 Реактивация	Свежие TIL прямо к REP Активация всей культуры $5x10^8$ фидерных клеток 30 мкг OKT3/флакон G-Rex 100MCS Добавление 500 мл среды+ ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
День 10 - 11 Масштаб-е или субкультиви-рование TIL	≤4 G-REX 500MCS Масштаб-е всей культуры переносом 1л из GREX 100MCS в GREX 500MCS и добавление 4л среды + ИЛ-2 (3000 МЕ/мл) /флакон
День 16 - 17 Сбор	Сбор LOVO- авт. устройство для промывания клеток Криоконсервация в Plasmalyte 1% ЧСА: CS10

Фиг. 92

Тест	Критерии приемлемости	Процесс Gen 3.1 Тест / Gen 3.0
Кол-во клеток (TVC)	Gen 3.1 > 30% относительно Gen 3.0	Соответствует
% Жизнеспособности	≥70% Жизнеспособности	Соответствует
Иммунофенотипирование (%CD3+/ %CD45+)	≤5% различие между процессами Gen 3.1 и Gen 3.0	Соответствует
Секреция ИФНγ	Gen 3.1 ≥ Gen 3.0	Соответствует

Фиг. 93

Количество клеток в день реактивации

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее ср. кол-во *Объем
Gen 3.0 (A) L4063	500	Всего	7,10E+04	6,81E+04		6,96E+04	3,48E+07
		Живые	5,27E+04	5,09E+04		5,18E+04	2,59E+07
		Мертвые	1,83E+04	1,72E+04		1,78E+04	8,88E+06
		%Жизнесп.	74,30%	74,80%		74,55%	
Gen 3.1 (A) L4063	500	Всего	1,41E+05	1,38E+05		1,40E+05	6,98E+07
		Живые	1,31E+05	1,26E+05		1,29E+05	6,43E+07
		Мертвые	9,84E+03	1,21E+04		1,10E+04	5,49E+06
		%Жизнесп.	93,00%	91,20%		92,10%	
Gen 3.1 Тест L4063	500	Всего	3,26E+05	3,28E+05		3,27E+05	1,64E+08
		Живые	2,83E+05	2,96E+05		2,90E+05	1,45E+08
		Мертвые	4,25E+04	3,16E+04		3,71E+04	1,85E+07
		%Жизнесп.	87,00%	90,30%		88,65%	
Gen 3.0 (A) L4064	500	Всего	1,59E+04	1,75E+04		1,67E+04	8,35E+06
		Живые	1,39E+04	1,44E+04		1,47E+04	7,35E+06
		Мертвые	1,98E+03	2,02E+03		2,00E+03	1,00E+06
		%Жизнесп.	87,50%	88,50%		88,00%	
Gen 3.1 Контр. L4064	500	Всего	2,02E+05	1,98E+05		2,00E+05	1,00E+08
		Живые	1,88E+05	1,83E+05		1,86E+05	9,28E+07
		Мертвые	1,38E+04	1,51E+04		1,45E+04	7,23E+06
		%Жизнесп.	93,20%	92,40%		92,80%	
Gen 3.1 Тест L4064	500	Всего	2,70E+05	3,15E+05		2,93E+05	1,46E+08
		Живые	2,55E+05	3,01E+05		2,78E+05	1,39E+08
		Мертвые	1,51E+04	1,38E+04		1,45E+04	7,23E+06
		%Жизнесп.	94,40%	95,60%		95,00%	

Фиг. 94

Количество клеток в день масштабирования

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее ср. кол-во *Объем
Gen 3.0 (A) L4063	1000	Всего	6,57E+05	6,61E+05		6,59E+05	6,59E+08
		Живые	6,00E+05	6,14E+05		6,07E+05	6,07E+08
		Мертвые	5,71E+04	4,68E+04		5,20E+04	5,20E+07
		%Жизнесп.	91,30%	92,90%		92,10%	
Gen 3.1 Контр. L4063	1000	Всего	1,66E+06	1,82E+06		1,74E+06	1,74E+09
		Живые	1,59E+06	1,72E+06		1,66E+06	1,66E+09
		Мертвые	7,17E+04	9,07E+04		8,12E+04	8,12E+07
		%Жизнесп.	95,70%	95,00%		95,35%	
Gen 3.1 Тест L4063	1000	Всего	1,88E+06	2,00E+06		1,94E+06	1,94E+09
		Живые	1,76E+06	1,89E+06		1,83E+06	1,83E+09
		Мертвые	1,20E+05	1,15E+05		1,18E+05	1,18E+08
		%Жизнесп.	93,60%	94,30%		93,95%	
Gen 3.0 (A) L4064	1000	Всего	7,95E+05	8,58E+05		8,27E+05	8,27E+08
		Живые	7,17E+05	7,78E+05		7,48E+05	7,48E+08
		Мертвые	7,85E+04	8,05E+04		7,95E+04	7,95E+07
		%Жизнесп.	90,10%	90,60%		90,35%	
Gen 3.1 Контр. L4064	1000	Всего	1,38E+06	1,32E+06		1,35E+06	1,35E+09
		Живые	1,31E+06	1,24E+06		1,28E+06	1,28E+09
		Мертвые	7,20E+04	8,13E+04		7,67E+04	7,67E+07
		%Жизнесп.	94,80%	93,80%		94,30%	
Gen 3.1 Тест L4064	1000	Всего	1,85E+06	1,76E+06		1,81E+06	1,81E+09
		Живые	1,76E+06	1,67E+06		1,72E+06	1,72E+09
		Мертвые	8,62E+04	8,95E+04		8,79E+04	8,79E+07
		%Жизнесп.	95,30%	94,90%		95,10%	

Фиг. 95

Количество клеток при сборе, L4063

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее ср. кол-во *Объем
Gen 3.0 (A) L4063 до LOVO	602,4	Всего	1,68E+07	1,70E+07		1,69E+07	1,02E+10
		Живые	1,52E+07	1,54E+07		1,53E+07	9,22E+09
		Мертвые	1,60E+06	1,64E+06		1,63E+06	9,79E+08
		%Жизнесп.	90,50%	90,30%		90,40%	
Gen 3.1 Контр. L4063 до LOVO	497,1	Всего	3,39E+07	3,90E+07		3,65E+07	1,81E+10
		Живые	3,25E+07	3,73E+07		3,49E+07	1,73E+10
		Мертвые	1,41E+06	1,63E+06		1,52E+06	7,56E+08
		%Жизнесп.	95,80%	95,80%		95,80%	
Gen 3.1 Тест L4063 до LOVO	552,3	Всего	3,71E+07	3,62E+07		3,67E+07	2,02E+10
		Живые	3,56E+07	3,51E+07		3,54E+07	1,95E+10
		Мертвые	1,50E+06	1,09E+06		1,30E+06	7,15E+08
		%Жизнесп.	96,00%	97,00%		96,50%	
Gen 3.0 (A) L4063 после LOVO	165	Всего	5,37E+07	5,73E+07	5,50E+07	5,53E+07	9,13E+09
		Живые	4,32E+07	4,52E+07	4,36E+07	4,40E+07	7,26E+09
		Мертвые	1,04E+07	1,21E+07	1,14E+07	1,13E+07	1,86E+09
		%Жизнесп.	80,50%	78,80%	79,30%	79,53%	
Gen 3.1 Контр L4063 после LOVO	165	Всего	1,21E+08	1,01E+08	1,22E+08	1,15E+08	1,89E+10
		Живые	1,10E+08	8,85E+07	1,09E+08	1,03E+08	1,69E+10
		Мертвые	1,11E+07	1,23E+07	1,27E+07	1,20E+07	1,99E+09
		%Жизнесп.	90,90%	87,80%	89,60%	89,43%	
Gen 3.1 Тест L4063 после LOVO	175	Всего	1,05E+08	1,20E+08		1,13E+08	1,97E+10
		Живые	9,93E+07	1,14E+08		1,07E+08	1,87E+10
		Мертвые	5,51E+06	6,14E+06		5,83E+06	1,02E+09
		%Жизнесп.	94,70%	94,90%		94,80%	

Фиг. 96

Количество клеток при сборе, L4064

ID	Объем (мл)		Кол-во 1 (кл/мл)	Кол-во 2 (кл/мл)	Кол-во 3 (кл/мл)	Среднее (кл/мл)	Общее ср. кол-во *Объем
Gen 3.0 (A) L4064 до LOVO	641,3	Всего	1,99E+07	1,94E+07		1,97E+07	1,26E+10
		Живые	1,83E+07	1,94E+07		1,89E+07	1,21E+10
		Мертвые	1,60E+06	1,68E+06		1,64E+06	1,05E+09
		%Жизнесп.	92,00%	92,00%		92,00%	
Gen 3.1 Контр. L4064 до LOVO	493,4	Всего	3,98E+07	3,87E+07		3,93E+07	1,94E+10
		Живые	3,65E+07	3,55E+07		3,60E+07	1,78E+10
		Мертвые	3,31E+06	3,22E+06		3,27E+06	1,61E+09
		%Жизнесп.	91,70%	91,70%		91,70%	
Gen 3.1 Тест L4064 до LOVO	593,4	Всего	3,92E+07	3,79E+07		3,86E+07	2,29E+10
		Живые	3,67E+07	3,54E+07		3,61E+07	2,14E+10
		Мертвые	2,55E+06	2,50E+06		2,53E+06	1,50E+09
		%Жизнесп.	93,50%	93,40%		93,45%	
Gen 3.0 (A) L4064 после LOVO	165	Всего	8,58E+07	8,34E+07		8,46E+07	1,40E+10
		Живые	7,56E+07	7,46E+07		7,51E+07	1,24E+10
		Мертвые	1,02E+07	8,79E+06		9,50E+06	1,57E+09
		%Жизнесп.	88,10%	89,50%		88,80%	
Gen 3.1 Контр. L4064 после LOVO	165	Всего	1,13E+08	1,22E+08	1,15E+08	1,18E+08	1,94E+10
		Живые	9,21E+07	1,01E+08	9,45E+07	9,66E+07	1,59E+10
		Мертвые	2,14E+07	2,13E+07	2,07E+07	2,14E+07	3,52E+09
		%Жизнесп.	81,20%	82,60%	82,10%	81,90%	
Gen 3.1 Тест L4064 после LOVO	165	Всего	1,33E+08	1,45E+08		1,39E+08	2,29E+10
		Живые	1,14E+08	1,22E+08		1,18E+08	1,95E+10
		Мертвые	1,94E+07	2,26E+07		2,10E+07	3,47E+09
		%Жизнесп.	85,40%	84,40%		84,90%	

Фиг. 97

	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD4/CD27 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD4/CD28 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD4/CD56 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD4/CD57 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD8/CD27 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD8/CD28 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD8/CD56 | Частота исх. (%)	S1IS2/Bcel/Xhol/CD14-/TCRab/CD8/CD57 | Частота исх. (%)
	CD4+/CD27	CD4+/CD28	CD4+/CD56	CD4+/CD57	CD8+/CD27	CD8+/CD28	CD8+/CD56	CD8+/CD57
L4063-Gen 3.0	3,8	82,7	0,42	6,7	15	47,5	3,29	0,28
L4063-Gen 3.1 KT	2,08	71,8	0,53	17	25,6	23	2,33	1,18
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	3,35	80,2	0,69	20,5	30,5	24,5	4,19	1,07
L4064-Gen 3.0	6,66	97,5	0,54	16	14,1	88	6,62	1,29
L4064-Gen 3.1 KT	0,72	73,5	0,54	7,58	3,3	45,1	10,3	1,95
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	2,24	66,8	0,34	7,98	6,69	37,3	9,98	2,54

Фиг. 98

		S1/S2/Все/Жив/ Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив/ CD14-/Частота исх.(%)	S1/S2/Все/Жив/ CD14-/CD8-/NK | Частота нулевых (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/CD19 | Частота нулевых (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab | Частота нулевых (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/ CD4 | Частота нулевых (%)	S1/S2/All/Live/ CD14-/TCRab/ CD4/CD27| Частота нулевых (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/ CD4/CD28|Частота нулевых (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/ CD4/CD56|Частота нулевых(%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/ CD4/CD57|Частота нулевых (%)
		L/D	CD34+	NK	CD19	TCRa/b+	TCRab+ /CD4+	TCRab+/CD4+ /CD27	TCRab+ /CD4+ /CD28	TCRab+ /CD4+ /CD56	TCRab+ /CD4+ /CD57
L4063-Gen 3.0	C10 10.fcs	82.2	0.13	1.3	0.083	88.6	56.4	2.34	46.6	0.24	3,78
L4063-Gen 3.1 KT	C11 11.fcs	83.4	0.035	0.15	0.033	97.5	85.8	1.78	61.6	0.46	14.6
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	C12 12.fcs	91	0.032	1.04	0.007%	95.5	77.5	2.6	62.1	0.54	15.9
L4064-Gen 3.0	D1 13.fcs	76.6	0.18	2.45	0.11	93	33.8	2.25	32.9	0.18	5,4
L4064-Gen 3.1 KT	D2 14.fcs	83.1	0.068	0.23	0.011	97.3	64.8	0.46	47.6	0.35	4,91
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	D3 15.fcs	89.5	0.043	0.52	0.023	96.7	57.4	1.28	38.4	0.2	4,58

	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив/ CD14-/TCRab/CD4/ Q5: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив/ CD14-/TCRab/CD4/ Q6: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q7: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Жив./ CD14-/TCRab/CD4/ Q8: CD62L-DV421-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)
	TEMRA	НЕОБУЧ.	CM	EM	TEMRA	НЕОБУЧ.	CM	EM
L4063-Gen 3.0	0.58	0.77	11.2	87.4	0.36	0.26	45.6	53.7
L4063-Gen 3.1 KT	1.22	0.8	1.56	94.4	0.66	0.22	16.8	82.3
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	0.88	0.35	1.39	97.4	0.36	0.17	29.3	70.2
L4064-Gen 3.0	1.47	1.3	14.2	83	1.09	0.53	46.3	52.1
L4064-Gen 3.1 KT	0.41	0.096	5.28	94.2	0.73	0.11	30.6	68.6
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	0.44	0.07	2.78	95.7	0.37	0.035	29.9	69.9

	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q1: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q2: CCR7-PE-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q3: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q4: CCR7-PE-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q5: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q6: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A+ | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q7: CD62L-DV421-A+, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRab/CD8/ Q8: CD62L-DV421-A-, CD45RA-AF700-A- | Частота исх. (%)	S1/S2/Все/Живые/ CD14-/TCRgd | Частота исх. (%)
	TEMRA	НЕОБУЧ.	CM	EM	TEMRA	НЕОБУЧ.	CM	EM	
L4063-Gen 3.0	1.72	1.54	18.1	79.1	3.06	0.67	32	74.3	6.47
L4063-Gen 3.1 KT	1.65	0.62	3.39	94.3	0.52	0.097	15.8	83.5	1.11
L4063-Gen 3.1+Фидерн	2.65	0.73	1.66	95	0.89	0.41	29.7	789	2
L4064-Gen 3.0	6.49	4.31	10.9	70.3	6.05	3.31	61.9	39.8	2.36
L4064-Gen 3.1 KT	6.3	0.59	7.15	86	8	0.72	18.9	72.4	1.68
L4063-Gen 3.1+Фидерн	5.83	0.22	3.17	90.8	5.38	0.96	18.2	75.5	1.86

Фиг. 99

		S/S/Все/Ж /CD3/ CD4/284 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж /CD3/ BTLA | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж /CD3/ CD4/CD25 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD4/CD69 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD4/CD95 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD4/CD103 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD4/KLRG1+ | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD4/LAG3 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Живые CD3/CD4/PD1 | Частота исх. (%)
						CD4				
		284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	KLRG1+	LAG3+	PD1+
L4063-Gen 3.0	G10 10.fcs	2.1	99.7	48.6	27.1	99.9	0.69	1.61	5.57	77.4
L4063-Gen 3.1 KT	G11 11.fcs	0.62	95.4	10.5	37.7	99.9	1.15	3.7	8.24	58.4
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	G12 12.fcs	0.95	96.9	3.89	21.5	99.5	0.43	3.32	3.28	41.6
L4064-Gen 3.0	H1 13.fcs	2	99.5	58.2	39.4	99.6	1.44	11.4	1.49	34.1
L4064-Gen 3.1 KT	H2 14.fcs	1.18	98.8	41.7	35.6	99	1.25	8.3	1.6	28.4
L4063-Gen 3.1+Фидерн.	H3 15.fcs	1.26	98.1	32.1	30.5	97.3	1.19	10.7	1.42	26.7

S/S/Все/Живые CD3/CD4/Tigit | Частота исх. (%)	S/S/Все/Живые CD3/CD4/Tigit | Частота исх. (%)
CD4+	CD4+
TIGIT+	TIM3+
68.5	58
40.3	42.4
30.3	59.4
45.8	61
52.1	58.4
52.2	56.8

Фиг. 100

S/S/Все/Ж /CD3/ CD8/284 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж /CD3/ CD8/BTLA | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж /CD3/ CD8/CD25 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/CD69 Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/CD95 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/CD103 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/CXCR3 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/KLRG1+ | Частота исх. (%)	S/S/Все/Ж / CD3/CD8/LAG3 | Частота исх. (%)	S/S/Все/Живые CD3/CD8/PD1 Частота исх. (%)
				CD8+					
284+	BTLA	CD25+	CD69+	CD95+	CD103+	CXCR3	KLRG1	LAG3	PD1
2,1	2,1	99,7	48,6	27,1	99,9	0,69	1,61	5,57	77,4
0,62	0,62	95,4	10,5	37,7	99,9	1,15	3,7	8,24	58,4
0,95	0,95	96,9	3,89	21,5	99,5	0,43	3,32	3,28	41,6
2	2	99,5	58,2	39,4	99,6	1,44	11,4	1,49	34,1
1,18	1,18	98,8	41,7	35,6	99	1,25	8,3	1,6	28,4
1,26	1,26	98,1	32,1	30,5	97,3	1,19	10,7	1,42	26,7

S/S/Все/Живые CD3/CD8/Tigit | Частота исх. (%)	S/S/Все/Живые CD3/CD8/Tim3 | Частота исх. (%)
CD8	CD8
TIGIT	TIM3
90,8	66,7
93,7	49,1
93,3	58,6
92,1	65,6
90,4	46,8
90,5	43,6

Фиг. 101

Данные продуцирования ИФНγ
Фиг. 7-L4063

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	STD1	STD1	STD1	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки	
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	КИ*	
B	STD2	STD2	STD2	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки	
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	КИ*	
C	STD3	STD3	STD3	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки	
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	27	27	27	КИ*	
D	STD4	STD4	STD4	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки	
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	81	81	81	КИ*	
E	STD5	STD5	STD5	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	ID лунки	
	62,5	62,5	62,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	КИ*	
F	STD6	STD6	STD6	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	ID лунки	
	31,3	31,3	31,3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	КИ*	
G	STD7	STD7	STD7	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-C-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-c-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-c-He-стимулир.	ID лунки	
	15,6	15,6	15,6	27	27	27	27	27	27	27	27	27	КИ*	
H	STD8	STD8	STD8	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.0-A-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-B-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-c-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-c-He-стимулир.	TL- Gen 3.1-c-He-стимулир.	ID лунки	
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	81	81	81	КИ*	

TL- Gen 3.0-A-Gen 3.0
TL- Gen 3.1-B-Gen 3.1Контроль
TL- Gen 3.1-C-Gen 3.1Тест
*Концентрация/Разведение

22,4
22,2

Фиг. 102A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			Разведения	Регистр.А	Регистр.В	Регистр.С	Средн.	Средн.
A	3.405	3.397	3.403	1.442	1.299	1.259	0.728	0.783	0.787	3.154	3.319	3.099	450	TIL-Gen 3.0-A-Стимулир.	3	1003.686	887.473	864.345	918.5	906.5
	0.047	0.049	0.054	0.049	0.048	0.045	0.044	0.045	0.043	0.057	0.057	0.077	570		9	1025.524	849.796	828.801	901.4	
	3.358	3.347	3.349	1.393	1.252	1.223	0.684	0.738	0.744	3.097	3.262	3.023	Дельта		27	1049.571	894.323	864.792	936.2	
	1002.565	997.786	998.498	334.562	295.824	288.115	149.315	162.815	164.235	895.979	958.429	867.067	Концентрация		81	1075.611	792.798	741.476	870.0	
				1003.686	887.473	864.346	447.944	488.444	492.706	2687.938	2875.286	2601.171	Кратность разведения							
B	1.47	2.04	2.034	0.585	0.504	0.493	0.308	0.325	0.338	1.97	1.4553	1.298	450	TIL-Gen 3.1-Контроль Стимулир.	3	447.944	488.444	492.706	476.4	428.1
	0.049	0.052	0.05	0.046	0.045	0.044	0.045	0.044	0.04	0.04	0.043	0.045	570		9	428.928	467.618	515.257	457.3	
	1.921	1.988	1.984	0.54	0.459	0.449	0.253	0.281	0.299	1.33	1.41	1.252	Дельта		27	417.785	528.637	492.676	476.4	
	488.001	508.782	507.605	113.947	94.422	92.089	47.659	51.958	56.14	317.208	339.278	296.013	Концентрация		81	279.628	304.005	293.856	292.5	
				1025.524	845.796	828.801	428.928	467.618	505.257	2854.874	3053.502	2664.121	Кратность разведения							
C	1.108	1.123	1.127	0.269	0.244	0.241	0.171	0.192	0.179	0.552	0.571	0.524	450	TIL-Gen 3.1-Тест Стимулир.	3	2687.938	2875.286	2801.171	2721.5	2862.7
	0.045	0.045	0.047	0.043	0.042	0.044	0.043	0.047	0.041	0.045	0.045	0.045	570		9	2854.874	3053.502	2664.121	2857.9	
	1.062	1.077	1.08	0.226	0.202	0.197	0.128	0.145	0.138	0.506	0.526	0.479	Дельта		27	2857.431	2987.505	2678.8	2841.2	
	245.406	249.416	250.019	38.873	33.123	32.029	15.474	19.579	17.877	105.831	110.648	99.215	Концентрация		81	2994.798	3229.505	2867.786	3030.7	
				1049.571	894.323	864.792	417.785	528.537	482.676	2857.431	2987.505	2678.8	Кратность разведения							
D	0.635	0.625	0.641	0.161	0.147	0.143	0.135	0.125	0.127	0.253	0.274	0.259	450	TIL-Gen 3.0-A-Нестимулир.	3	5.644	6.641	5.029	5.8	5.8
	0.052	0.044	0.052	0.042	0.043	0.042	0.056	0.045	0.048	0.045	0.044	0.048	570		9	0	0	0	0.0	
	0.583	0.581	0.589	0.119	0.134	0.102	0.079	0.08	0.079	0.218	0.23	0.211	Дельта		27	0	0	0	0.0	
	124.607	123.9	125.852	13.279	9.768	9.154	3.452	3.753	3.628	36.973	39.87	35.405	Концентрация		81	0	0	0	0.0	
				1075.611	792.798	741.476	279.628	304.005	293.856	2994.798	3229.505	2867.785	Кратность разведения							
E	0.368	0.377	0.368	0.117	0.115	0.114	0.108	0.104	0.107	0.107	0.101	0.097	450	TIL-Gen 3.1-Контроль Нестимулир.	3	0	0	0	0.0	0.0
	0.043	0.044	0.044	0.045	0.041	0.042	0.047	0.044	0.048	0.053	0.047	0.043	570		9	0	0	0	0.0	
	0.325	0.333	0.324	0.072	0.074	0.072	0.051	0.05	0.059	0.053	0.054	0.054	Дельта		27	0	0	0	0.0	
	62.49	64.276	62.276	1.881	2.214	1.676	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация		81	0	0	0	0.0	
				5.644	6.641	5.029	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения							
F	0.242	0.247	0.239	0.1	0.122	0.102	0.097	0.095	0.096	0.101	0.094	0.099	450	TIL-Gen 3.1-Тест Нестимулир.	3	0	0	0	0.0	0.0
	0.044	0.044	0.043	0.041	0.042	0.042	0.043	0.042	0.044	0.049	0.042	0.043	570		9	0	0	0	0.0	
	0.198	0.203	0.196	0.059	0.06	0.06	0.053	0.054	0.062	0.053	0.052	0.056	Дельта		27	0	0	0	0.0	
	32.291	33.432	31.72	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация		81	0	0	0	0.0	
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения							
G	0.186	0.187	0.172	0.102	0.096	0.098	0.095	0.09	0.091	0.09	0.093	0.099	450							
	0.056	0.055	0.043	0.047	0.041	0.042	0.041	0.042	0.045	0.043	0.042	0.044	570							
	0.13	0.132	0.129	0.055	0.055	0.056	0.054	0.048	0.047	0.047	0.061	0.056	Дельта							
	15.979	16.58	15.666	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация							
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения							
H	0.106	0.107	0.1	0.102	0.1	0.1	0.1	0.099	0.098	0.1	0.095	0.098	450							
	0.045	0.045	0.044	0.041	0.042	0.042	0.041	0.042	0.043	0.043	0.043	0.044	570							
	0.062	0.062	0.056	0.061	0.058	0.058	0.059	0.058	0.055	0.056	0.052	0.053	Дельта							
	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Концентрация							
				<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000	Кратность разведения							

Фиг. 102B

Данные продуцирования ИФНγ
Фиг. 7-L4063

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	STD1	STD1	STD1	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки
	1000	1000	1000	3	3	3	3	3	3	3	3	3	KP*
B	STD2	STD2	STD2	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки
	500	500	500	9	9	9	9	9	9	9	9	9	KP*
C	STD3	STD3	STD3	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки
	250	250	250	27	27	27	27	27	27	27	27	27	KP*
D	STD4	STD4	STD4	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-стимулир.	ID лунки
	125	125	125	81	81	81	81	81	81	81	81	81	KP*
E	STD5	STD5	STD5	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	ID лунки
	62,5	62,5	62,5	3	3	3	3	3	3	3	3	3	KP*
F	STD6	STD6	STD6	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	ID лунки
	31,3	31,3	31,3	9	9	9	9	9	9	9	9	9	KP*
G	STD7	STD7	STD7	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	ID лунки
	15,6	15,6	15,6	27	27	27	27	27	27	27	27	27	KP*
H	STD8	STD8	STD8	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.0-A-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-B-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	TIL- Gen 3.1-C-не-стимулир.	ID лунки
	0	0	0	81	81	81	81	81	81	81	81	81	KP*

TIL- Gen 3.0-A-Gen 3.0
TIL- Gen 3.1-B-Gen 3.1Контроль
TIL- Gen 3.1-C-Gen 3.1Тест
* Концентрация/Кратность разведения

22,6
22,6

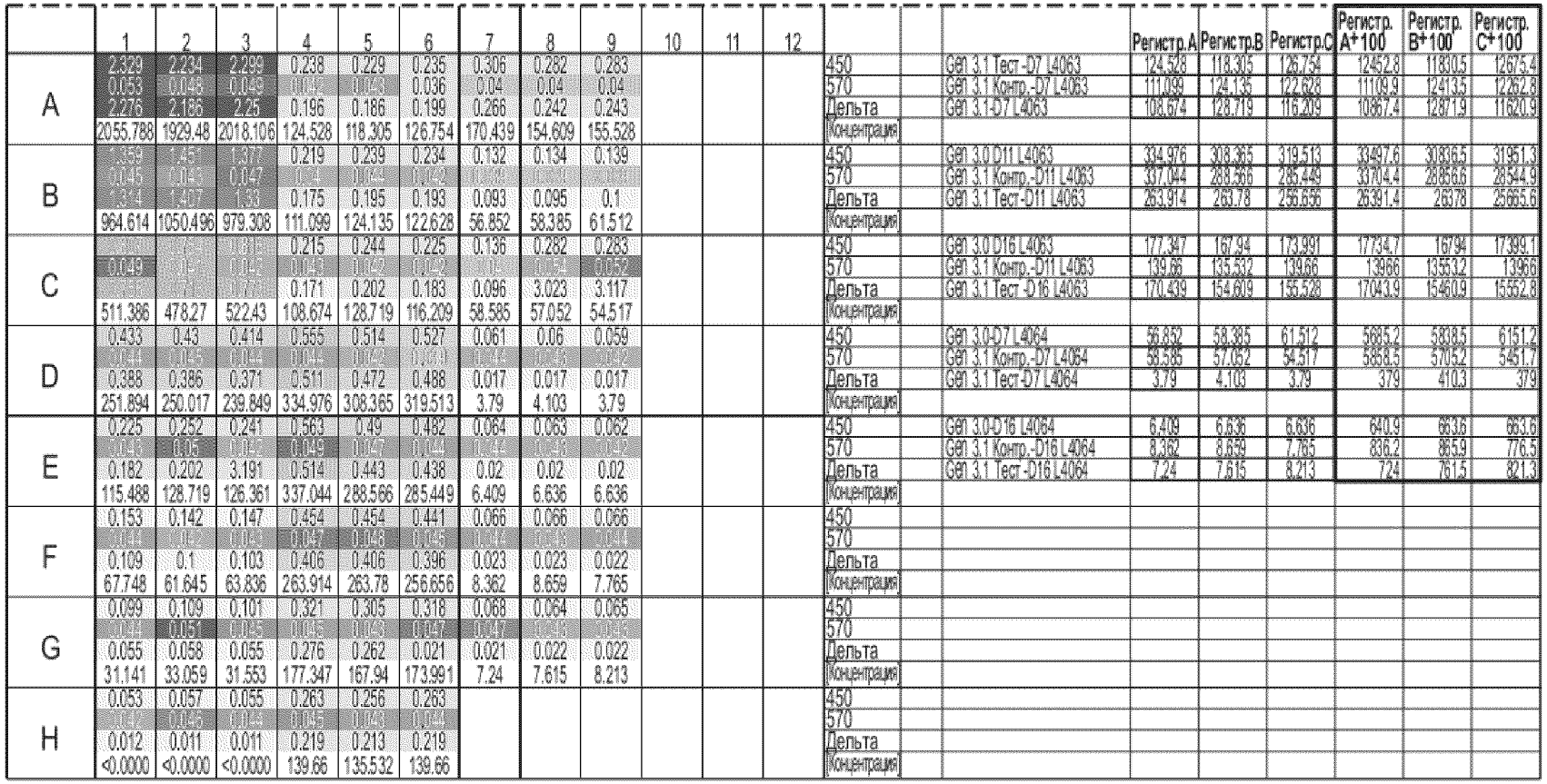
Фиг. 103A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				Разведение	Регистр.A	Регистр.B	Регистр.C	Средн.	Средн.
A	3.185	3.22	3.239	1.921	1.889	1.886	3.07	3.076	3.168	3.438	3.447	3.503	450	TIL - Gen3.0-A- Стимулир.		3	1500.622	1568.61	1559.291	1542.8	1484.5
	0.047	0.049	0.047	0.028	0.028	0.046	0.053	0.054	0.052	0.049	0.054	0.048	570			9	1486.698	1502.481	1501.971	1497.1	
	3.139	3.173	3.191	1.892	1.86	1.841	3.017	3.023	3.117	3.389	3.392	3.455	Дельта			27	1447.487	1487.513	1455.761	1463.6	
	988.846	1002.314	1009.363	500.207	522.87	519.764	941.686	943.838	980.208	1087.626	1089.11	1126.295	Концентрация			81	1392.905	1449.751	1470.802	1434.5	
				1500.622	1568.61	1559.291	2825.058	2831.514	2940.624	3262.879	3267.331	3378.885	Кратность разведения								
B	1.801	1.867	1.81	0.732	0.739	0.741	1.34	1.385	1.415	1.557	1.615	1.672	450	TIL - Gen3.0-A-Стимулир.		3	2825.058	2831.514	2940.624	2865.7	3130.0
	0.018	0.057	0.014	0.038	0.039	0.041	0.05	0.054	0.039	0.048	0.043	0.046	570			9	3080.537	2985.191	3072.713	3046.1	
	1.783	1.81	1.77	0.694	0.7	0.7	1.29	1.331	1.376	1.509	1.572	1.626	Дельта			27	3281.421	3122.775	3207.538	3203.9	
	493.919	507.341	496.135	165.189	166.942	166.886	342.282	331.688	341.413	420.895	432.774	450.716	Концентрация			81	3470.732	3328.622	3413.835	3404.4	
				1486.698	1502.481	1501.971	3080.537	2985.191	3072.713	3788.057	3894.965	4056.443	Кратность разведения								
C	1.031	1.03	1.026	0.323	0.324	0.321	0.573	0.559	0.569	0.668	0.655	0.698	450	TIL - Gen3.1 Контроль Стимулир.		3	3262.879	3267.331	3378.885	3303.0	3863.0
	0.034	0.034	0.04	0.012	0.037	0.039	0.036	0.042	0.042	0.041	0.055	0.045	570			9	3788.057	3894.965	4056.443	3913.2	
	0.997	0.994	0.986	0.281	0.287	0.282	0.537	0.515	0.527	0.236	0.612	0.653	Дельта			27	3929.339	3839.827	4152.144	3973.8	
	253.163	252.211	249.864	53.611	55.093	53.917	121.534	115.658	118.798	42.146	142.216	153.783	Концентрация			81	4107.196	4152.519	4526.823	7262.2	
				1447.487	1487.513	1455.761	3281.421	3122.775	3207.538	3929.339	3839.827	4152.144	Кратность разведения								
D	0.579	0.579	0.59	0.177	0.178	0.179	0.283	0.275	0.279	0.317	0.315	0.338	450	TIL - Gen3.1 Тест Стимулир.		3	32.413	23.924	18.322	24.9	29.3
	0.035	0.035	0.044	0.014	0.012	0.012	0.046	0.043	0.044	0.047	0.05	0.049	570			9	23.936	17.959	9.948	17.3	
	0.544	0.537	0.546	0.133	0.136	0.137	0.238	0.231	0.236	0.269	0.272	0.29	Дельта			27	18.223	9.043	7.065	11.4	
	123.535	121.425	124.112	17.073	17.898	18.158	42.849	41.094	42.146	50.706	51.266	55.887	Концентрация			81	107.303	39.226	43.826	63.5	
				1382.905	1449.751	1470.802	3470.732	3328.622	3413.835	4107.196	4152.519	4526.823	Кратность разведения								
E	0.353	0.367	0.386	0.149	0.136	0.13	0.154	0.154	0.164	0.22	0.209	0.21	450	TIL - Gen3.0-A-Нестимулир.		3	35.99	36.819	42.025	38.3	23.3
	0.045	0.044	0.053	0.013	0.013	0.015	0.018	0.012	0.014	0.02	0.019	0.018	570			9	29.816	28.291	32.497	30.2	
	0.307	0.323	0.343	0.106	0.093	0.085	0.111	0.112	0.12	0.178	0.166	0.164	Дельта			27	10.043	2.294	0	4.1	
	60.383	64.414	69.586	10.804	7.975	6.107	11.997	12.273	14.008	27.905	24.995	24.585	Концентрация			81	15.362	30.128	16.81	20.8	
				32.413	23.924	18.322	35.99	36.819	42.025	83.716	74.986	73.755	Кратность разведения								
F	0.232	0.23	0.231	0.113	0.108	0.105	0.114	0.113	0.115	0.135	0.136	0.138	450	TIL - Gen3.1-Контроль Нестимулир.		3	83.716	0	0	0.0	0.0
	0.045	0.044	0.045	0.014	0.012	0.011	0.012	0.013	0.012	0.012	0.013	0.015	570			9	70.965	0	0	0.0	
	0.187	0.186	0.186	0.069	0.066	0.061	0.072	0.071	0.073	0.093	0.093	0.093	Дельта			27	31.452	0	0	0.0	
	30.2	29.784	29.759	2.66	1.995	1.105	3.313	3.143	3.611	7.885	7.975	7.997	Концентрация			81	65.646	0	0	0.0	
				23.936	17.959	9.948	29.816	28.291	32.497	70.965	71.771	71.973	Кратность разведения								
G	0.167	0.173	0.166	0.102	0.1	0.099	0.098	0.097	0.099	0.104	0.11	0.109	450								
	0.047	0.05	0.055	0.018	0.014	0.012	0.014	0.013	0.013	0.012	0.015	0.015	570								
	0.121	0.131	0.121	0.059	0.057	0.057	0.057	0.056	0.05	0.062	0.064	0.067	Дельта								
	14.194	16.65	14.194	0.675	0.335	0.262	0.372	0.085	<0.000	1.165	1.628	2.347	Концентрация								
				18.223	9.043	7.065	10.043	2.294	<0.000	31.452	43.943	63.363	Кратность разведения								
H	0.111	0.103	0.099	0.104	0.1	0.101	0.099	0.103	0.1	0.101	0.104	0.103	450								
	0.053	0.05	0.053	0.012	0.011	0.011	0.011	0.015	0.013	0.012	0.015	0.019	570								
	0.059	0.06	0.056	0.062	0.058	0.058	0.057	0.058	0.057	0.06	0.062	0.054	Дельта								
	0.598	0.81	0.154	1.325	0.484	0.541	0.19	0.372	0.208	0.81	1.265	<0.000	Концентрация								
				107.303	39.226	43.826	15.632	30.128	16.81	65.646	102.436	<0.000	Кратность разведения								

Фиг. 103B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12									
A	STD1	STD1	STD1	Gen 3.1 Тест-D7 L4063	Gen 3.1 Тест-D7 L4063	Gen 3.1 Тест-D7 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	2000	2000	2000										К/Р*								
B	STD2	STD2	STD2	Gen 3.1 Контр.- D7 L4063 L4063	Gen 3.1 Контр.- D7 L4063 L4063	Gen 3.1 Контр.- D7 L4063 L4063	Gen 3.0- D7 L4064	Gen 3.0- D7 L4064	Gen 3.0- D7 L4064	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	1000	1000	1000										К/Р*								
C	STD3	STD3	STD3	Gen 3.0- D7 L4063	Gen 3.0- D7 L4063	Gen 3.0- D7 L4063	Gen 3.1 Контр.- D7 L4064	Gen 3.1 Контр.- D7 L4064	Gen 3.1 Контр.- D7 L4064	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	500	500	500										К/Р*								
D	STD4	STD4	STD4	Gen 3.0- D11 L4063	Gen 3.0- D11 L4063	Gen 3.0- D11 L4063	Gen 3.1 Тест-D7 L4064	Gen 3.1 Тест-D7 L4064	Gen 3.1 Тест-D7 L4064	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	250	250	250										К/Р*								
E	STD5	STD5	STD5	Gen 3.1 Контр.-- D11 L4063	Gen 3.1 Контр.- D11 L4063	Gen 3.1 Контр.-- D11 L4063	Gen 3.0- D16 L4064	Gen 3.0- D16 L4064	Gen 3.0- D16 L4064	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	125	125	125										К/Р*								
F	STD6	STD6	STD6	Gen 3.1 Тест-D11 L4063	Gen 3.1 Тест-D11 L4063	Gen 3.1 Тест-D11 L4063	Gen 3.1 Контр.- D16 L4064	Gen 3.1 Контр.- D16 L4064	Gen 3.1 Контр.- D16 L4064	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	62,5	62,5	62,5										К/Р*								
G	STD7	STD7	STD7	Gen 3.0- D16 L4063	Gen 3.0- D16 L4063	Gen 3.0- D16 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Gen 3.1 Тест-D16 L4063	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	31,3	31,3	31,3										К/Р*								
H	STD8	STD8	STD8	Gen 3.1 Контр.- D16 L4063	Gen 3.1 Контр.- D16 L4063	Gen 3.1 Контр.- D16 L4063	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	Незаполн.	ID лунки								
	0	0	0										К/Р*		D7=День 7= инициация Rep						
															D11= День 11=Маштабирование						
															D16= День 16= Сбор						
23															* Концентрация/Кратность разведения						
23																					

Фиг. 104A



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.329	2.234	2.299	0.238	0.229	0.235	0.306	0.282	0.283			
	0.053	0.048	0.049	0.042	0.043	0.036	0.04	0.04	0.04			
	2.276	2.186	2.25	0.196	0.186	0.199	0.266	0.242	0.243			
	2055.788	1929.48	2018.106	124.528	118.305	126.754	170.439	154.609	155.528			
B	1.359	1.45	1.377	0.219	0.239	0.234	0.132	0.134	0.139			
	0.045	0.044	0.047	0.044	0.044	0.042	0.046	0.042	0.044			
	1.314	1.407	1.33	0.175	0.195	0.193	0.093	0.095	0.1			
	964.614	1050.496	979.308	111.099	124.135	122.628	56.852	58.385	61.512			
C	0.265	0.275	0.315	0.215	0.244	0.225	0.136	0.282	0.283			
	0.049	0.05	0.042	0.043	0.042	0.042	0.046	0.042	0.052			
	0.216	0.225	0.273	0.171	0.202	0.183	0.096	3.023	3.117			
	511.386	478.27	522.43	108.674	128.719	116.209	58.585	57.052	54.517			
D	0.433	0.43	0.414	0.555	0.514	0.527	0.061	0.06	0.059			
	0.044	0.045	0.044	0.042	0.042	0.039	0.045	0.043	0.042			
	0.388	0.386	0.371	0.511	0.472	0.488	0.017	0.017	0.017			
	251.894	250.017	239.849	334.976	308.365	319.513	3.79	4.103	3.79			
E	0.225	0.252	0.241	0.563	0.49	0.482	0.064	0.063	0.062			
	0.043	0.05	0.042	0.049	0.047	0.044	0.045	0.043	0.042			
	0.182	0.202	3.191	0.514	0.443	0.438	0.02	0.02	0.02			
	115.488	128.719	126.361	337.044	288.566	285.449	6.409	6.636	6.636			
F	0.153	0.142	0.147	0.454	0.454	0.441	0.066	0.066	0.066			
	0.044	0.042	0.043	0.047	0.048	0.046	0.047	0.043	0.043			
	0.109	0.1	0.103	0.406	0.406	0.396	0.023	0.023	0.022			
	67.748	61.645	63.836	263.914	263.78	256.656	8.362	8.659	7.765			
G	0.099	0.109	0.101	0.321	0.305	0.318	0.068	0.064	0.065			
	0.044	0.051	0.045	0.045	0.043	0.047	0.047	0.043	0.043			
	0.055	0.058	0.055	0.276	0.262	0.021	0.021	0.022	0.022			
	31.141	33.059	31.553	177.347	167.94	173.991	7.24	7.615	8.213			
H	0.053	0.057	0.055	0.263	0.256	0.263						
	0.041	0.045	0.043	0.045	0.043	0.044						
	0.012	0.011	0.011	0.219	0.213	0.219						
	<0.0000	<0.0000	<0.0000	139.66	135.532	139.66						

			Регистр.A	Регистр.B	Регистр.C	Регистр. A+100	Регистр. B+100	Регистр. C+100
450		Gen 3.1 Тест -D7 L4063	124.528	118.305	126.754	12452.8	11830.5	12675.4
570		Gen 3.1 Контр.-D7 L4063	111.099	124.135	122.628	11109.9	12413.5	12262.8
Дельта		Gen 3.1-D7 L4063	108.674	128.719	116.209	10867.4	12871.9	11620.9
Концентрация								
450		Gen 3.0 D11 L4063	334.976	308.365	319.513	33497.6	30836.5	31951.3
570		Gen 3.1 Контр.-D11 L4063	337.044	288.366	285.449	33704.4	28856.6	28544.9
Дельта		Gen 3.1 Тест-D11 L4063	263.914	263.78	256.656	26391.4	26378	25665.6
Концентрация								
450		Gen 3.0 D16 L4063	177.347	167.94	173.991	17734.7	16794	17399.1
570		Gen 3.1 Контр.-D11 L4063	139.66	135.532	139.66	13966	13553.2	13966
Дельта		Gen 3.1 Тест -D16 L4063	170.439	154.609	155.528	17043.9	15460.9	15552.8
Концентрация								
450		Gen 3.0-D7 L4064	58.852	58.385	61.512	5885.2	5838.5	6151.2
570		Gen 3.1 Контр.-D7 L4064	58.585	57.052	54.517	5858.5	5705.2	5451.7
Дельта		Gen 3.1 Тест-D7 L4064	3.79	4.103	3.79	379	410.3	379
Концентрация								
450		Gen 3.0-D16 L4064	6.409	6.636	6.636	640.9	663.6	663.6
570		Gen 3.1 Контр.-D16 L4064	8.362	8.659	7.765	836.2	865.9	776.5
Дельта		Gen 3.1 Тест -D16 L4064	7.24	7.615	8.213	724	761.5	821.3
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								
450								
570								
Дельта								
Концентрация								

Фиг. 104B

№ образца	Описание - Gen 3.1 Оптимизация	Глюкоза (г/л)	Лактат (г/л)	Аммиак (ммоль/л)	Глутамин (ммоль/л)	Glutamax (ммоль/л)	Glutamax-Глутамин (ммоль/л)
13	Gen 3.0-День 16 Первый раунд #L4063	1,52	1,07	2,06	1,91	2,11	0,20
14	Gen 3.1 Контроль - День 16 Первый раунд #L4063	0,90	1,74	2,50	1,34	1,49	0,15
15	Gen 3.1 Тест - День 16 Первый раунд #L4063	0,96	1,64	2,49	1,33	1,47	0,14
16	Gen 3.0- День 11 Первый раунд #L4063	1,42	0,70	1,83	1,70	1,86	0,16
17	Gen 3.1 Контроль - День 11 Первый раунд #L4063	0,90	1,08	2,24	1,07	1,19	0,11
18	Gen 3.1 Тест - День 11 Первый раунд #L4063	0,84	1,21	2,25	1,11	1,23	0,12
19	Gen 3.0-День 7 Первый раунд #L4063	1,76	0,20	1,88	2,04	2,23	0,19
20	Gen 3.1 Контроль - День 7 Первый раунд #L4063	1,73	0,22	1,86	2,00	2,19	0,19
21	Gen 3.1 Тест - День 7 Первый раунд #L4063	1,41	0,50	1,96	1,98	2,15	0,17
22	Gen 3.0 День 16 Второй раунд #L4064	2,76	1,52	1,00	0,68	0,77	0,09
23	Gen 3.1 Контроль - День 16 Второй раунд #L4064	2,14	1,95	0,99	0,64	0,73	0,08
24	Gen 3.1 Тест - День 16 Второй раунд #L4064	2,20	1,89	0,94	0,64	0,71	0,07
25	Gen 3.0-День 7 Второй раунд #L4064	4,26	0,08	0,71	1,29	1,43	0,14
26	Gen 3.1 Контроль - День 7 Второй раунд #L4064	4,14	0,22	0,78	1,17	1,29	0,12
27	Gen 3.1 Тест - День 7 Второй раунд #L4064	3,82	0,49	0,89	1,09	1,20	0,11

Фиг. 105

Порядок	Название		Геометр. Среднее Зонд-ФИТЦ А	Геометр. Среднее Зонд-ФИТЦ А	Средн. 1301	Средн. Т	Длина относительно 1301	
A1	Gen 3.0-L4063	A1 10.1.fcs	86	42,5				
A2		A2 10.2.fcs	85,4	42,3	85,7	42,4		
A3		A3 10.3.fcs	4585	207				
A4		A4 10.4.fcs	4389	216	4487	211,5	7,684093	
A5	Gen 3.1Контроль L4063	A5 11.1.fcs	82,7	33,3				
A6		A6 11.2.fcs	86	32,9	84,35	33,1		
A7		A7 11.3.fcs	4696	180				
A8		A8 11.4.fcs	4641	175	4668,5	177,5	6,299968	
B1	Gen 3.1 Тест - L4063	B1 12.1.fcs	95,1	28,8				
B2		B2 12.2.fcs	84,7	26,7	89,9	27,75		
B3		B3 12.3.fcs	4764	169				
B4		B4 12.4.fcs	4800	174	4782	171,5	6,12732	
B5	Gen 3.0 -L4064	B5 13.1.fcs	101	40,3				
B6		B6 13.2.fcs	89,6	34,1	95,3	37,2		
B7		B7 13.3.fcs	4300	174				
B8		B8 13.4.fcs	4367	172	4333,5	173	6,408381	
C1	Gen 3.1 Контроль L4064	C1 14.1.fcs	92.1	31,1				
C2		C2 14.2.fcs	88,6	29,6	90,35	30,35		
C3		C3 14.3.fcs	4111	169				
C4		C4 14.4.fcs	4443	172	4277	170,5	6,69509	
C5	Gen 3.1 Тест - L4064	C5 15.1.fcs	89,7	25,7				
C6		C6 15.2.fcs	85,7	24,7	87,7	25,2		
C7		C7 15.3.fcs	4342	172				
C8		C8 15.4.fcs	4560	166	4451	169	6,591341	

Фиг. 106

Общие частоты

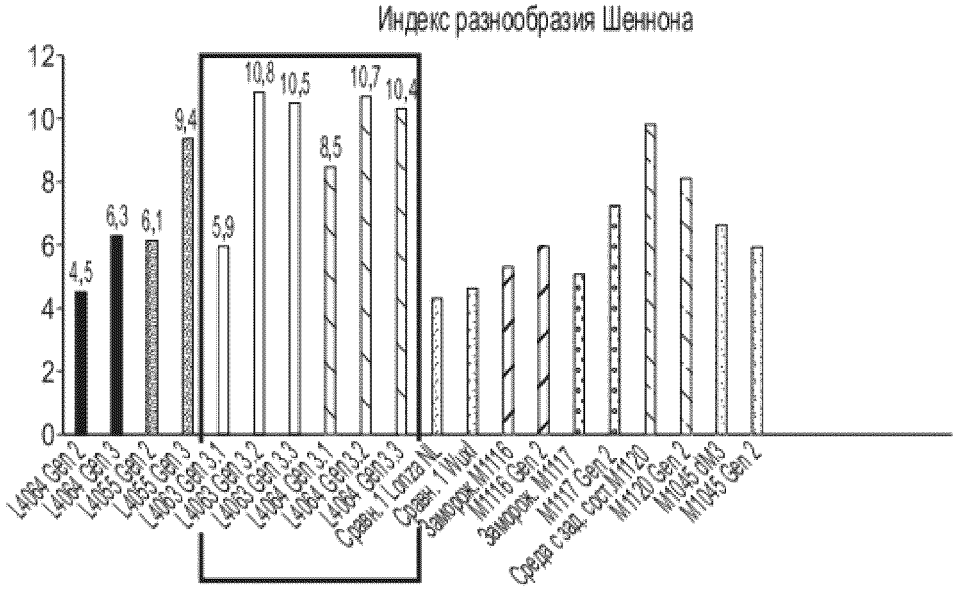
Субъект	Исходный образец	Кол-во uCDR3	Сравниваемый образец	Кол-во uCDR3	Кол-во общих uCDR3	Кол-во uCDR3
L4063	L63GA	14005	L63GB	18149	3240	23,13459479
L4063	L63GA	14005	L63GC	17181	2959	21,12816851
L4063	L63GA	15107	L64GB	21460	5486	36,31429139
L4063	L63GA	15107	L64GC	21503	5541	36,67836102
Код:	L63GA = L4063 Gen 3.0					
	L63GB = L4063 Gen 3.1 контр.					
	L63GC = L4063 Gen 3.1 тест					
	L64GA = L4064 Gen 3.0					
	L64GB = L4064 Gen 3.1 контр.					
	L64GC = L4064 Gen 3.1 тест					

Лидирующие 80%

Субъект	образец 1	Кол-во uCDR3	образец 2	Кол-во uCDR3	Кол-во общих uCDR3	% общих в кол. B
L4063	L63GA	1104	L63GB	2437	1000	90,57971
L4063	L63GA	1104	L63GC	2331	975	88,31522
L4064	L64GA	2478	L64GB	3246	2186	88,2163
L4064	L64GA	2478	L64GC	3263	2163	87,28814
Код:	L63GA = L4063 Gen 3.0					
	L63GB = L4063 Gen 3.1 контр.					
	L63GC = L4063 Gen 3.1 тест					
	L64GA = L4064 Gen 3.0					
	L64GB = L4064 Gen 3.1 контр.					
	L64GC = L4064 Gen 3.1 тест					

Фиг. 107

Разнообразие Шеннона



Только 6 образцов включали
в график разнообразия Шеннона
для оптимизации Gen 3.1

L4063 Gen 3.1 = L4063 Gen 3.0
L4063 Gen 3.2 = L4063 Gen 3.1 контроль
L4063 Gen 3.3 = L4063 Gen 3.1 тест

L4064 Gen 3.1 = L4064 Gen 3.0
L4064 Gen 3.2 = L4064 Gen 3.1 контроль
L4064 Gen 3.3 = L4064 Gen 3.1 тест

Фиг. 108

Процесс 2A: приблизительно 22 дня после этапов A-E

1. **ЭТАП A**

Взятие образца опухоли у пациента

2. **ЭТАП B**

Фрагментация и первое размножение

От 3 дней до 14 дней

3. **ЭТАП C**

Переход от первого размножения к второму размножению

Без хранения, закрытая система

4. **ЭТАП D**

Второе размножение

ИЛ-2, OKT-3 и антигенпрезентирующие фидерные клетки

Закрытая система

5. **ЭТАП E**

Сбор TIL с этапа D

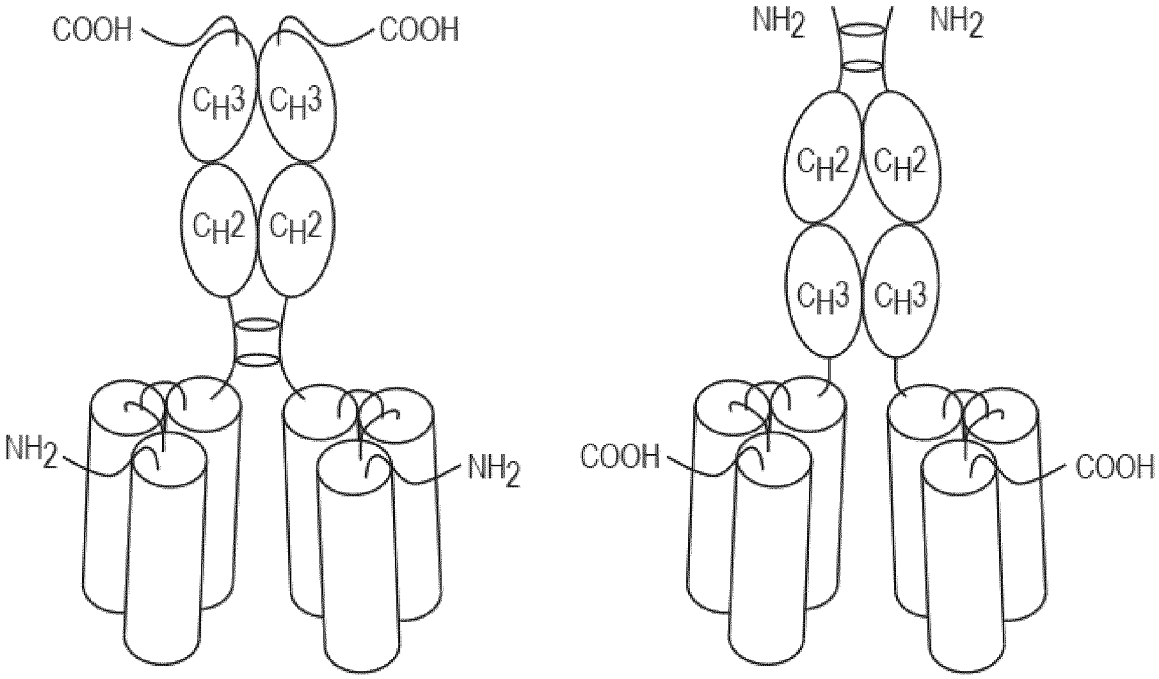
Закрытая система

6. **ЭТАП F**

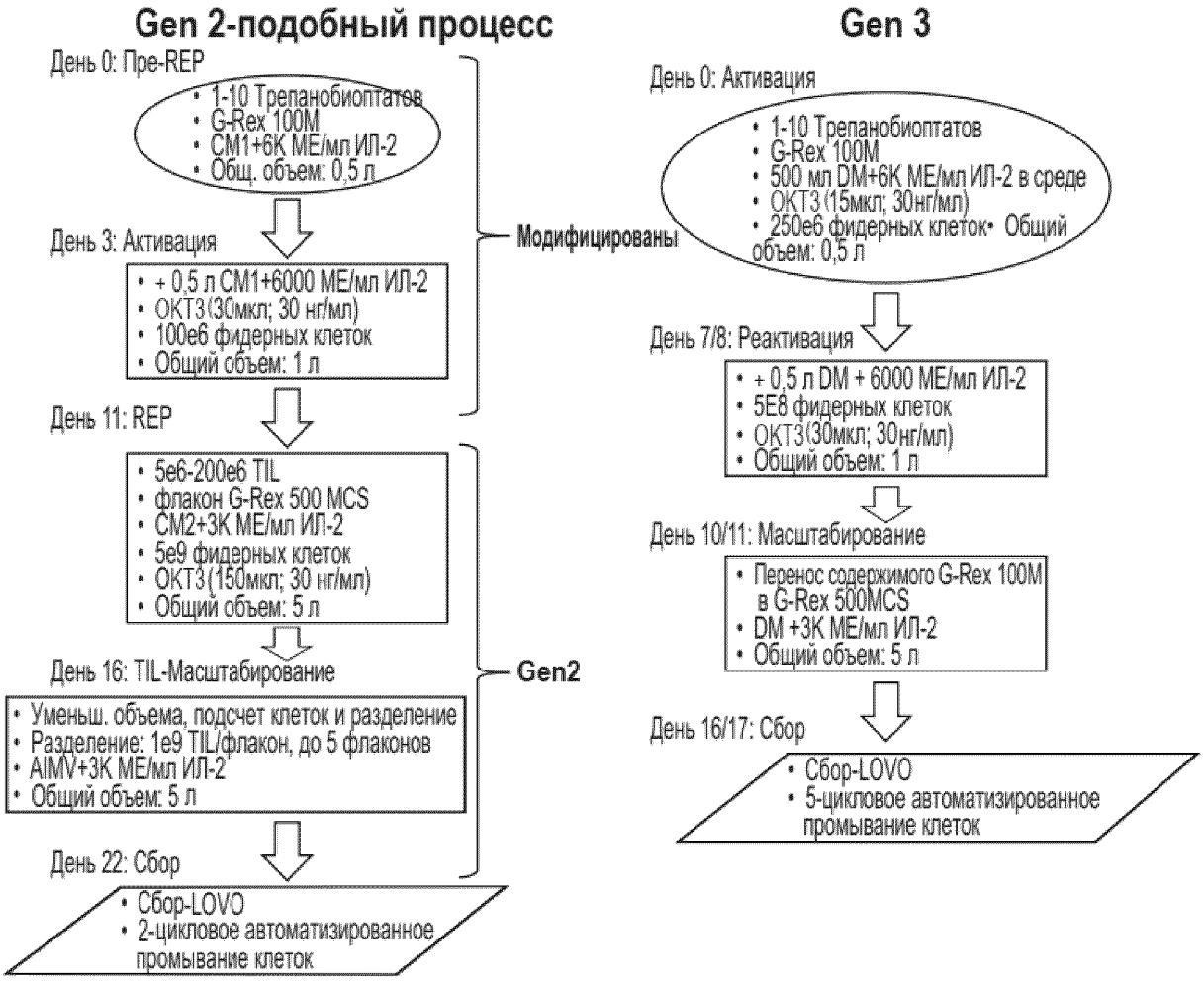
Получение итогового состава и/или перенос в мешок для инфузии

(необязательно криоконсервация)

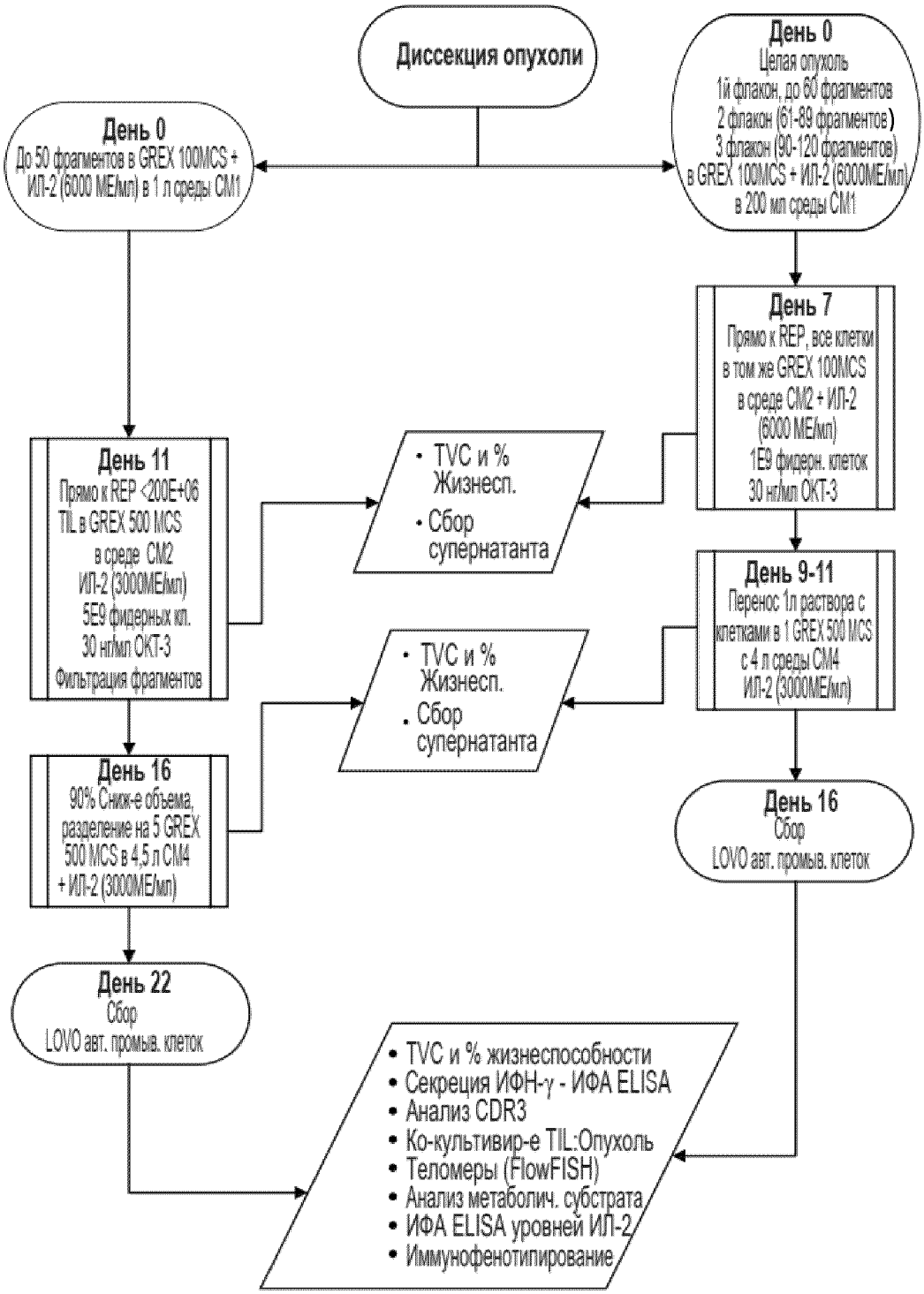
Фиг. 109


COOH
COOH
CH3
CH3
CH2
CH2
NH2
NH2
Структура I-A
NH2
NH2
CH2
CH2
CH3
CH3
COOH
COOH
Структура I-B

Фиг. 110


Gen 2-подобный процесс
Gen 3
День 0: Пре-REP
• 1-10 Трепанобиоптатов
• G-Rex 100M
• CM1+6K МЕ/мл ИЛ-2
• Общ. объем: 0,5 л
День 3: Активация
• + 0,5 л CM1+6000 МЕ/мл ИЛ-2
• OKT3 (30мкл; 30 нг/мл)
• 100e6 фидерных клеток
• Общий объем: 1 л
День 11: REP
• 5e6-200e6 TIL
• флакон G-Rex 500 MCS
• CM2+3K МЕ/мл ИЛ-2
• 5e9 фидерных клеток
• OKT3 (150мкл; 30 нг/мл)
• Общий объем: 5 л
День 16: TIL-Масштабирование
• Уменьш. объема, подсчет клеток и разделение
• Разделение: 1e9 TIL/флакон, до 5 флаконов
• AIMV+3K МЕ/мл ИЛ-2
• Общий объем: 5 л
День 22: Сбор
• Сбор-LOVO
• 2-цикловое автоматизированное промывание клеток
Модифицированы
Gen2
День 0: Активация
• 1-10 Трепанобиоптатов
• G-Rex 100M
• 500 мл DM+6K МЕ/мл ИЛ-2 в среде
• OKT3 (15мкл; 30нг/мл)
• 250e6 фидерных клеток• Общий объем: 0,5 л
День 7/8: Реактивация
• + 0,5 л DM + 6000 МЕ/мл ИЛ-2
• 5E8 фидерных клеток
• OKT3 (30мкл; 30нг/мл)
• Общий объем: 1 л
День 10/11: Масштабирование
• Перенос содержимого G-Rex 100M в G-Rex 500MCS
• DM +3K МЕ/мл ИЛ-2
• Общий объем: 5 л
День 16/17: Сбор
• Сбор-LOVO
• 5-цикловое автоматизированное промывание клеток

Фиг. 111


Диссекция опухоли
День 0
До 50 фрагментов в GREX 100MCS + ИЛ-2 (6000 МЕ/мл) в 1 л среды СМ1
День 0
Целая опухоль
1й флакон, до 60 фрагментов
2 флакон (61-89 фрагментов)
3 флакон (90-120 фрагментов)
в GREX 100MCS + ИЛ-2 (6000МЕ/мл)
в 200 мл среды СМ1
День 7
Прямо к REP, все клетки в том же GREX 100MCS в среде СМ2 + ИЛ-2 (6000 МЕ/мл)
1Е9 фидерн. клеток
30 нг/мл ОКТ-3
• TVC и % Жизнесп.
• Сбор супернатанта
День 11
Прямо к REP <200E+06 TIL в GREX 500 MCS
в среде СМ2
ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
5Е9 фидерных кл.
30 нг/мл ОКТ-3
Фильтрация фрагментов
День 9-11
Перенос 1л раствора с клетками в 1 GREX 500 MCS с 4 л среды СМ4
ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
• TVC и % Жизнесп.
• Сбор супернатанта
День 16
90% Сниж-е объема, разделение на 5 GREX 500 MCS в 4,5 л СМ4 + ИЛ-2 (3000МЕ/мл)
День 16
Сбор
LOVO авт. промыв. клеток
День 22
Сбор
LOVO авт. промыв. клеток
• TVC и % жизнеспособности
• Секреция ИФН-γ - ИФА ELISA
• Анализ CDR3
• Ко-культивир-е TIL:Опухоль
• Теломеры (FlowFISH)
• Анализ метаболич. субстрата
• ИФА ELISA уровней ИЛ-2
• Иммунофенотипирование

Фиг. 112